Aus dem Institut für Anaesthesiologie und Transfusionswesen
Direktor: Professor Dr. R. Schorer
und der
Chirurgischen Klinik und Poliklinik
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski
der Universität Tübingen

Bestimmung von Praekallikrein, Kallikrein, Plasminogen, Antiplasmin und Fibronektin in gefrorenem Frischplasma

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
SABINE WALLMEIER, geb. Adolph
aus Tübingen

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543922_0091

Aus dem Institut für Anaesthesiologie und Transfusionswesen
Direktor: Professor Dr. R. Schorer
und der
Chirurgischen Klinik und Poliklinik
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski
der Universität Tübingen

Bestimmung von Praekallikrein, Kallikrein, Plasminogen, Antiplasmin und Fibronektin in gefrorenem Frischplasma

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
SABINE WALLMEIER, geb. Adolph
aus Tübingen

1986

Dekan: Professor Dr. J. Dichgans
1. Berichterstatter: Professor Dr. W. Heller
2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Schorer

Meinen Eltern
und anderen ...

Inhaltsverzeichnis

		Seite
	Abkürzungen	1
1.	Einleitung	2
2.	Allgemeiner Teil	3
2.1.	Fresh frozen plasma (FFP)- Tiefgefrorenes Plasma (GFP)	3
2.2.	Gerinnungsschema	8
2.3.	Praekallikrein	8
2.4.	Kallikrein	10
2.5.	Plasminogen	14
2.6.	Antiplasmin	15
2.7.	Fibronektin	16
3.	Material und Methoden	22
3.1.	Probanden	22
3.2.	Material	22
3.2.1.	Klinische Materialien	23
3.2.2.	Labor Materialien	23
3.3.	Methoden	24
3.3.1.	Klinische Methoden	24
3.3.2.	Labor Methoden	25
3.3.2.1.	Praekallikrein	25
3.3.2.2.	Kallikrein	27
3.3.2.3.	Plasminogen	28
3.3.2.4.	Antiplasmin	31
3.3.2.5.	Fibronektin	32
3.3.3.	Statistische Methoden	33
4.	Ergebnisse	34
4.1.	Praekallikrein	34
4.2.	Kallikrein	37
4.3.	Plasminogen	40

4.4. Antiplasmin 43
4.5. Fibronektin 47

5. Diskussion 51

6. Zusammenfassung 53

7. Literaturverzeichnis 54

Abkürzungen:

°C - Grad Celsius
FFP - Fresh frozen plasma
g - Erdbeschleunigung g=9,81 m/s^2
GFP - Tiefgefrorenes Frischplasma
h - Stunde
min - Minute
n - Anzahl
sec - Sekunde
z.B. - zum Beispiel

1. Einleitung

Ursrünglich wurde gefrorenes Frischplasma vorwiegend zur Behandlung von Blutungen bei Hämophilen eingesetzt und gewann zunehmende Bedeutung im Rahmen einer konsequenten Blutkomponententherapie (75).

In der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen, gehört es bereits zur Routine, vor allem bei einem großen geplanten Eingriff, bei dem ein größerer Blutverlust zu befürchten ist, z.B. Hüftgelenksendoprotese, vom Patienten, mittels Plasmapherese gefrorenes Frischplasma zu gewinnen, das ihm dann im Bedarfsfall reinfundiert wird. So gelingt es, die Gefahr von Transfusionszwischenfällen zu reduzieren.

Bisher ging man davon aus, daß gefrorenes Frischplasma alle Bestandteile, besonders auch die labilen Gerinnungsfaktoren und deren Inhibitoren, in nahezu unveränderter Form enthält. Es wurde beschrieben, daß durch die Art des Einfrierens sowie des Auftauens und durch die Lagerungsbedingungen die Gerinnungsfaktoren in ihre Aktivität beeinflußt werden (75).

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß die Plasmabestandteile Praekallikrein, Kallikrein, Plasminogen, Antiplasmin und Fibronectin in den handelsüblichen Präparaten, die aus frischem Vollblut durch Zentrifugation, Abpressen und Schockgefrierung gewonnen werden, eine Veränderung erfahren haben. Es werden gefrorene Frischplasmen der Herstellungsorte Tübingen, Freiburg und Göttingen verglichen und solche unterschiedlicher Blutgruppenzugehörigkeit einander gegenübergestellt.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Fresh frozen plasma (FFP) - Tiefgefrorenes Frischplasma (GFP)

Im Jahre 1825 wurde durch den englischen Arzt Blundel die erste Bluttransfusion von Mensch zu Mensch durchgeführt (117). 1859 veröffentlicht Landois eine Statistik über 347 Transfusionen von Menschenblut, aus welcher hervorgeht, daß in nur 150 Fällen der Ausgang befriedigend war. Erst 1901 entdeckt Landsteiner das ABO - System und 1941 erbrachten er und Wiener den Nachweis des RH - Systems. Die Möglichkeit der Blutkonservierung, die Anfang der 40-er Jahre durch russische Forscher aufkam, brachte den Massendurchbruch der Bluttransfusion in die Therapie (95).

Der ständig steigende Bedarf an Blutkonserven und Blutbestandteilen, verlangt größte Sorgfalt bei der Ausnutzung des Frischblutes. Aus frischem Vollblut gewinnt man mittels physikalischer Methoden, wie z.B. Sedimentation, Zentrifugation und Filtration, die Blutkomponenten, wozu zellhaltige Blutkomponenten und Plasmakonserven gehören (95). Mit Hilfe chemischer Verfahren werden bestimmte Bestandteile angereichert oder in reiner Form dargestellt, sodaß Blut - bzw. Plasmafraktionen oder Blut - bzw. Plasmaderivate entstehen (Abb.1).

Von streng ausgewählten, freiwilligen Blutspendern, die in der Anamnese u.a. keine Hepatitis aufweisen, im Radioimmunassay auf HBs-Antigen, im AIDS-Test auf HTLV-III und im Luestest negativ sind, sowie normale SGPT - Werte haben, werden jeweils 500 ml Blut in Doppelplastikbeutel abgenommen, die als Stabilisator entweder ACD (acid citrate dextrose) oder CPD (citrate phosphate dextrose) Antikoagulans enthalten. Die Plasmapherese stellt ein alternatives Verfahren für die Plasmagewinnung dar. Hierbei

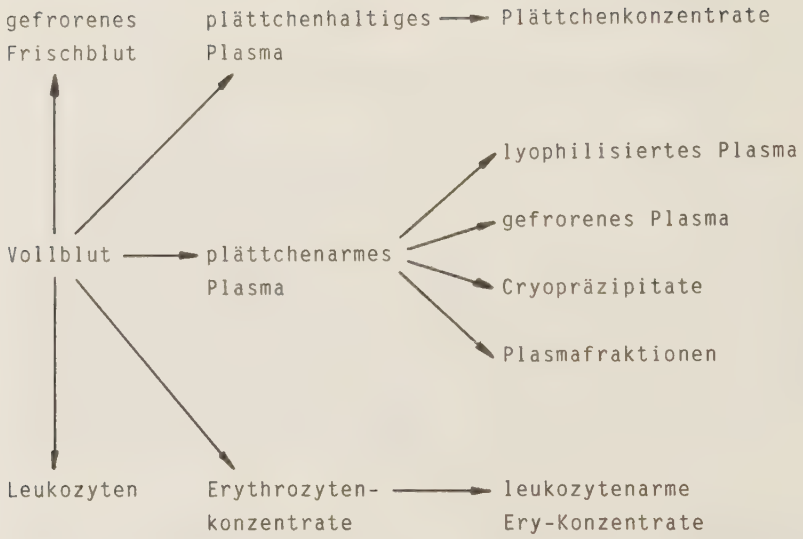


Abb.1: Übersicht der Produkte aus frischem Vollblut (47,124)

werden dem Spender die Erythrozyten wieder retransfundiert (93). Zwischen Blutspende und der Herstellung von gefrorenem Frischplasma sollten nicht mehr als 6h überschritten werden. Nach einer ersten Zentrifugation wird das überstehende Plasma in den Satellitenbeutel gepresst und es bleibt ein Erythrozytenkonzentrat zurück. Die Lagerung erfolgt bei - 40 °C (94).

Um die Aktivität labiler Gerinnungsfaktoren zu erhalten, muß die Präparation von GFP nach der Blutentnahme möglichst rasch erfolgen (4). Besonders der Faktor - VIII - Gehalt ist ein Maß für die Qualität. Er nimmt vor allem in den ersten sechs Stunden um ca. 30 % ab (75). Kritisch gestaltet sich die Einfriergeschwindigkeit. Abkühlung an der Luft bei -30 bis -40 °C führt zu einem unzulässigen Temperaturplateau im Bereich des Phasenüberganges. Dabei vergehen 3 - 4 Stunden,

bis das Material ganz durchgefroren ist (28). Im allgemeinen werden Alkohol / Trockeneisbäder oder elektrische Friergeräte mit Temperaturen von -70 °C bis -80 °C verwendet. Versuche, das Frischplasma mit Hilfe von flüssigem Stickstoff bei -180 °C einzufrieren, verliefen zwar erfolgreich, jedoch sind die Kosten für Apparate und Stickstoff relativ hoch (75).

Die Reduzierung der Thrombozytenzahl erfolgt während der zweiten Zentrifugation. Da Thrombozyten durch Einfrieren und Auftauen zerstört werden, kann das hierbei freigesetzte thromboplastische Material das Gerinnungssystem in unerwünschter Weise aktivieren. Damit erklärt sich einerseits die Verlängerung der Rekalzifizierungszeit in thrombozytenarmen Plasmen, anderseits die in gefrorenem thrombozytenhaltigen Material signifikant erniedrigte Faktor VIII - Aktivität oder die Erhöhung der Thrombogenizität von Prothrombinkomplexpräparaten, die man aus plättchenreichem Plasma gewinnt (75).

Gefrorenes Frischplasma muß man bei Temperaturen unterhalb -23 °C lagern, um Faktor - VIII Verluste zu vermeiden. Zu tiefe Lagerungstemperaturen beinhalten, hinsichtlich der Rekalzifizierungszeit, die Gefahr einer Qualitätseinbuße. Die optimale Aufbewahrungstemperatur soll -30 °C betragen. Im Hinblick auf die vielfach für Zwischenlagerung verwendeten normalen Tiefkühlschränke mit Temperaturen um -20 °C sollte sich die Laufzeit der Präparate sicherheitshalber auf sechs Monate beschränken (2,8,75,105). Der Auftauvorgang benötigt mit Hülle und unter gelegentlichem Schwenken im Wasserbad bei +37 °C etwa 20 Minuten. Das Plasma kann danach in kaltem Zustand transfundiert werden. Zusätzliche Erwärmung ist schädlich, da die dafür üblichen Geräte in der Regel auf definierte (Vollblut-) Volumina abgestimmt sind und dadurch Überheitzung mit Aktivitätsverlust auftreten kann. Um in

Notfällen die Auftauzeit zu verkürzen, wurde nach Alternativen gesucht, aber es konnte sich bislang keine weitere Methode durchsetzen. Das aufgetaute Präparat sollte innerhalb von 30 Minuten transfundiert werden (75). Als Qualitätskontrolle ist eine Chargenprüfung beim gefrorenen Frischplasma nicht möglich, weil es sich um Einzelspender - Präparationen handelt. Neben Stabilität und Pyrogenfreiheit sind für Stichproben geeignet die Messung der Konzentrationen von Hämoglobin, Kalium und Protein, sowie die Durchführung serologischer Tests und die Bestimmung der Aktivität von Gerinnungsfaktoren. Darüberhinaus darf der Titer der Isoagglutinine Anti - A und Anti - B 1:32 nicht überschreiten und Hämolysine dürfen nicht nachweisbar sein (96).

Zum Einsatz kommt GFP vor allem bei Blutungsneigung aufgrund komplexer Störungen des Hämostasesystems. Wesentliche Indikationen sind die Verdünnungskoagulopathie, z.B. im Rahmen massiver Transfusion hämostatisch unwirksamer Komponenten, und die disseminierte intravasale Gerinnung (DIC). Auch Verbrauchskoagulopathien im traumatisch hämorrhagischen Schock wurden mit bestem Erfolg allein durch Transfusion von gefrorenem Frischplasma korrigiert.

Beim Volumenersatz haben Plasmaexpander und Albuminlösung vor GFP den Vorrang, da trotz eingehender Vorsorge noch ein Hepatitisrisiko vorhanden ist. Ein zusätzliches Defizit plasmatischer Gerinnungsfaktoren korrigieren auch Frischplasma und Frischblut. Bei spezifischem Faktorenmangel ist GFP nur in Notfällen indiziert, da hierfür spezielle Konzentrate zur Verfügung stehen, die eine gezielte Behandlung mit kleineren Volumina ermöglichen. Sollen allerdings die Faktoren V und XI substituiert werden, muß mit GFP behandelt werden, da hiervon keine hochkonzentrierten Gerinnungspräparate vorliegen.

Hat ein akutes Leberversagen mangels an Faktoren II, V, VII, IX, X und Antithrombin III zur Gerinnungsstörung geführt, therapiert GFP besser, als die Verabreichung von Konzentraten (75).

Zu Nebenwirkungen kann es bei Transfusion von GFP auf einen Träger von kongenitalem Ig A - Mangel (Häufigkeit 1:850) kommen. Nach Übertragung von Plasma können sich Anti - Ig A - Antikörper ausbilden. Der Anti - Ig A - Komplex ist komplement - fixierend, was zu schweren Erscheinungen wie anaphylaktoide Reaktion, Fieber, Schüttelfrost, Blutdruckabfall und Zyanose führt. Bei einer von 20000 Transfusionen, soll mit dieser Komplikation zu rechnen sein (75).

Eine Substitution muß erfolgen, wenn das Gerinnungspotential des Empfängers 30 - 50% der Norm unterschreitet. Es sollten bei massiven Transfusionen 800 bis 1800 ml GFP (12 - 20 ml/kg KG) innerhalb von 4 - 6h gegeben werden. Dabei sollten bei einem Körpergewicht von 70kg mindestens 800ml GFP in einer Stunde transfundiert werden. Auf Entstehung von Hypervolämie muß geachtet werden. Aufgrund der Anti - A - und Anti - B - Isoagglutinine ist GFP blutgruppengleich zu verabreichen (75).

Zur Aktivitätskontrolle von Gerinnungsfaktoren in Blut - und Plasma - Konserven wurden vor allem die besonders labilen Faktoren V und VIII untersucht. Sie sind empfindliche Indikatoren für Einflüsse, die durch Lagerungsdauer, Einfrier - und Auftauart, sowie Lagerungstemperatur u.ä. entstehen (2). Bei Untersuchungen, die sich mit der Aktivierung des Gerinnungssystems in Blutkonserven beschäftigen, findet man, daß die Gerinnungsfaktoren in Blut - und Plasmakonserven eine höhere und stärker streuende Aktivität aufweisen, als unmittelbar nach der Entnahme. Wohingegen die immunologische Bestimmung niedrigere und

gleichbleibende Werte ergibt. Eine Ursache für die durchschnittlich 120%-ige Aktivität, bei normaler Faktorenmenge, ist die Verkürzung der Fibrinbildungszeit und nicht eine Aktivitätsvermehrung des jeweiligen Faktors. Diese scheinbare Aktivitätszunahme wird bei Faktoren der Kontaktphase, wie Faktor XII, XI, IX und VII, gefunden, denn diese können durch Fremdoberflächenaktivierung angeregt werden. Eine andere Ursache ist der unvollständigen Entzug von Calcium - Ionen aus der Konserve. Dies führt zur Aktivierung anderer Gerinnungsfaktoren, es können bereits Teilschritte der Gerinnung ablaufen und es resultiert gleichfalls eine Verkürzung der Fibrinbildungszeit (13,53).

Gefrorenes Frischplasma wird in Plastikbeutel abgefüllt, eingefroren, gelagert und aufgetaut, folglich ist es von vermehrter Aktivierung durch Fremdoberflächen betroffen.

Für diese Arbeit wurden die Aktivitäten von Plasmabestandteilen mittels Einphasentest und Immuno - Assay bestimmt.

2.2. Gerinnungsschema

Abb.2 zeigt, an welcher Stelle im Gerinnungssystem sich die im Folgenden besprochenen Faktoren befinden und wie diese in Zusammenhängen verknüpft sind.

2.3. Praekallikrein

Anfang der dreißiger Jahre zeigte Werle, daß Kallikrein in inaktiver Form - als sogenanntes Praekallikrein - in den Pankreassaft ausgeschieden und durch Trypsin aktiviert wird (97). Desweiteren findet er Kallikrein in den Speicheldrüsen und in den Nieren. Jahrzehnte später kann er diese Befunde

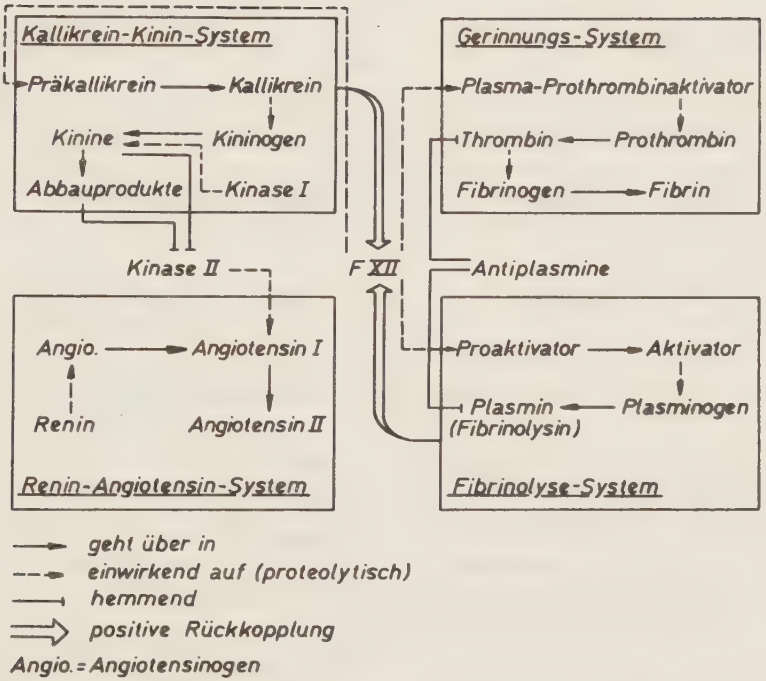
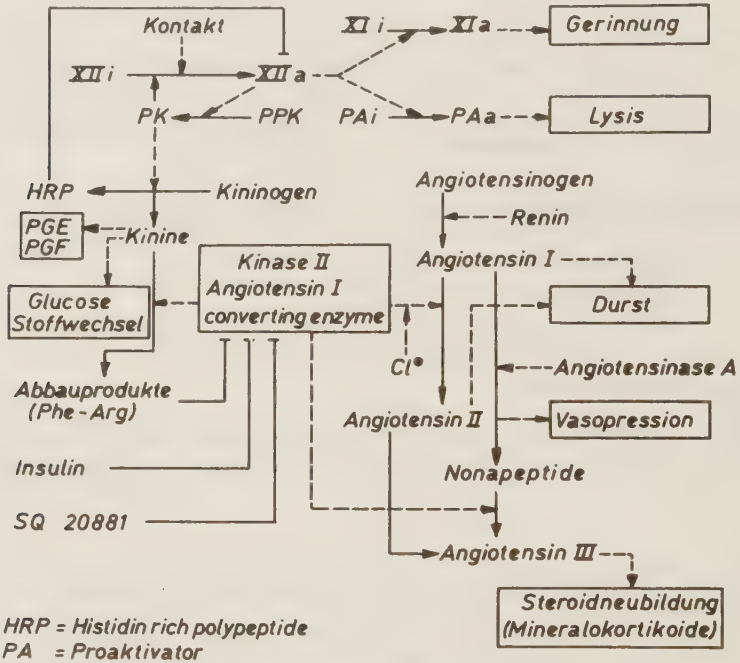


Abb.2: Modifiziertes Schema der der Verknüpfung der Kallikrein-Kinin-, Gerinnungs-, Fibrinolyse- und Renin-Angiotensin-Systeme (35)

ergänzen durch den Nachweis von Praekallikrein im Darm, Ausgangspunkt für Plasma - Praekallikrein. Plasma-Praekallikrein, auch Fletscher Faktor genannt, ist ein basisches Glykoprotein mit MG 195000. Es kommt in Konzentrationen von ca. 15µg/ml Plasma vor, wobei der Normalbereich bei 100 ± 26% liegt (3,38). Plasma - Praekallikrein wird durch die Wirkung des Faktors XII proteolytisch aktiviert. Voraussetzung hierfür ist, daß Faktor XII seinerseits aus inaktiver in aktive Form übergegangen ist. Dies geschieht im Rahmen der Festplasmaaktivierung durch nicht blutneutrale, also negativ geladene Oberflächen, wie z.B. Glas oder Kollagen (71).

2.4. Kallikrein

1925 wurde von dem Münchener Chirugen E. K. Frey in experimentellen Studien versucht, die Ursache der postoperativen reflektorischen Anurie aufzuklären. Im Harn entdeckte er ein neues blutdrucksenkendes Prinzip (74). Keine der damals bekannten Harnsubstanzen konnte für diese



HRP = Histidin rich polypeptide
PA = Proaktivator
PG = Prostaglandin
PK = Plasmakallikrein
PPK = Plasmapräkallikrein
SQ 20881 = Inhibitor d. Angiotensin I converting enzyme

—→ Umwandlung
---→ fördernd
—⊣ hemmend

Abb.3: Modifiziertes Schema der Esteroproteinasen-Systeme (48)

Wirkung verantwortlich gemacht werden. Dann gelang es aus Pankreasextrakten große Mengen dieses "Kreislaufhormons" zu gewinnen (36). Nach der griechischen Bezeichnung für Bauchspeicheldrüse wurde die Substanz Kallikrein genannt.

Eine Synopsis der Funktionen der Esteroproteinasen soll einen ersten Überblick schaffen über die zentrale Stellung von Kallikrein (Abb.3).

Aus inaktiven Vorstufen, den Praekallikreinen, entstehen durch Proteolyse die Kallikreine. Da bei der Bildung von Kallikreinen unterschiedliche Aktivatoren und Substrate Verwendung finden, wird zwischen Plasmakallikrein und Organkallikrein unterschieden. Bei der Bildung von Kallikreinen aus low molekular weight (LMW) Kininogenen haben Organkallikreine enzymatische Rollen. Hierbei ist eine vorherige Aktivierung der Praekallikreine durch Trypsin notwendig, damit Organkallikreine entstehen können. Wohingegen der Hageman - Faktor (XIIa) nötig ist, um aus Plasmapraekallikrein Plasmakallikrein entstehen zu lassen. Plasmakallikrein hat Wirkung auf high molekular weight (HMW) Kininogene, aus denen dann u.a. Bradykinin entsteht (48,49) (siehe Abb.2 und 3).

Einige Hauptaufgaben des Kallikrein - Kinin - Systems sind:

1. Hemmung des Hageman-Faktors durch das vom Plasmakallikrein aus dem Kininogenmolekül abgespaltene "Histidin-rich polypeptid",
2. gefäßerweiternde und blutdrucksenkende Wirkung der Kinine
3. Einfluß der Kinine auf Transportmechanismen im Stoffwechsel, z.B. Transport von Glukose in die Zelle (86),
4. Mittlerrolle zwischen Gerinnungs- und Lysesystem,
5. Beteiligung am Geburtsprozeß (3),

Die blutdrucksenkende Wirkung der Kallikreine wird durch deren Kininogenaseeigenschaften erklärt. Die so entstandenen

Kinine bewirken Prostaglandinfreisetzung und verdrängen Katecholamine von den adrenergen Rezeptoren (49). Mit ca. 100-fach höherer Affinität konkurieren die Kinine mit Angiotensin I um die Kinase II, das Konvertingenzym, wodurch die Angiotensin - II - Bildung verhindert und der Vasotonus indirekt beeinflußt wird (3,33,34) (siehe Abb.3).

Parallel dazu wird von Kallikrein Prorenin aktiviert (58), wodurch eine weitere Verknüpfung entsteht zwischen dem Renin - Angiotensin - und dem Kallikrein - Kinin - System (siehe Abb.3). Die Bedeutung dessen wird klar, wenn man betrachtet, daß bei Patienten, die an einer essentiellen Hypertonie leiden, die Ausscheidung von Kallikrein im Harn deutlich vermindert ist (82,83).

Ein besonderes Problem von Hochdruckpatienten ist eine Störung der Glukosetoleranz, unter der über 90% aller Hochdruckkranken leiden. Umgekehrt gilt, daß bei Diabetikern ein erhöhtes Risiko besteht, zusätzlich an einer Hypertonie zu erkranken. Hier besteht eine Beziehung zwischen dem Kallikrein - Kinin - System einerseits und dem Kohlenhydrattransport und - Metabolismus andererseits.

Abb.3 veranschaulicht, wie die Aktivitätsänderungen des Angiotensin I Konvertingenzyms durch das wechselnde Angebot von Inhibitoren bestimmt werden. Wenn z.B. Insulin, das ein solcher Inhibitor ist, nicht ausreichend vorhanden ist, kann das Enzym nicht genügend gehemmt werden und es entsteht ein Überschuß des pressorisch aktiven Angiotensin II (81,86).

Gerinnungsanomalien, die auch bei Diabetes und Hochdruck vorkommen, können ebenso in die Synopsis (Abb.3) eingeordnet werden, wie das Fehlen dieser beiden Erkrankungen bei kochsalzarm ernährten Populationen. Es läßt sich deutlich erkennen, daß die Umwandlung von Angiotensin I zum pressorisch aktiven Angiotensin II Chloridionen -

Konzentrationsabhängig ist, ein langfristig nutritiver Kochsalzmangel jedoch zu sekundärem Hyperaldosteronismus führen kann (3). Plasmakallikrein ist nicht nur insofern an der Gerinnung beteiligt, als es durch den Hageman - Faktor aktiviert wird, sondern auch dadurch, daß es diesen Faktor XII selbst aktiviert. So erfolgt die Induktion des Intrinsic - Systems der Gerinnung (66, 67) (Abb.2).

Wenn zu wenig Plasmakallikrein vorhanden ist, entsteht eine

Gerinnungsanomalie, die durch Organkallikrein nicht gebessert werden kann (25,87). Zur Fibrinolyse besteht durch den Hageman - Faktor eine enge Verbindung (22) (siehe auch 2.5. und 2.6.).

An der immunologischen Abwehr ist Kallikrein insofern beteiligt, als es die C1 - Esterase aus ihrer inaktiven Vorstufe freisetzt (25). Das Kallikrein - Kinin - System stellt ein wesentliches Element für viele physiologische Funktionen, insbesondere im Energiestoffwechsel dar und ist damit für die Erhaltung des Lebensprozesses unentbehrlich. Bei Patienten im septischen Schock ist ein rascher Abfall der Plasmaspiegel von Praekallikrein und Kininogen nachweisbar. Bei Verstorbenen war der Kallikreinspiegel nicht mehr angestiegen, jedoch bei Überlebenden steigen diese Plasmaspiegel wieder zügig an, so daß durch die Messung derselben eine Prognose möglich ist (99). Im Hundeexperiment konnte gezeigt werden, daß nach Verbrauch der inaktiven Kallikrein - Vorstufen ein praefinaler Kallikreinspiegelabfall erfolgte (5). Durch Messung der Plasmaspiegel von Praekallikrein und Kallikrein sollen Thrombosen und diffuse Gerinnungsgeschehen, z.B. disseminierte intravasale Gerinnung (DIC), früher erkennbar sein als durch Messung des Antithrombin - III - Spiegels (98).

2.5. Plasminogen

Plasminogen gehört der Globulinfraktion des Blutes an und ist chemisch ein Glukoprotein (6). Im Mittelpunkt des Fibrinolysesystems steht das Plasmin, welches unter dem Einfluß von Blut -, Gewebe - und heterogenen Aktivatoren aus Plasminogen gebildet wird. Im Blut sind z.B. Streptokinase und Lysokinase aktivierend, im Gewebe ist dies von Trypsin und Urokinase bekannt (21). Die Aktivierung von Plasminogen ist ein proteolytischer Vorgang, wobei die einleitenden Mechanismen nur teilweise klar sind. Folgende Aktivatoren des Plasminogens sind bekannt:

1. endogene intravasale Aktivatoren,
2. endogene extravasale Aktivatoren,
3. exogene heterologe Aktivatoren.

ad 1.: als endogene intravasale Aktivatoren werden ein labiler Blutfaktor und ein Gewebeaktivator, der der Gefäßwand zugeordnet wird, unterschieden. Dieser Weg der Bildung von Plasmin ist zur Hälfte an die Aktivierung des Gerinnungsfaktors XII und das HMW - Kininogen - Kinin - System gebunden und zum anderen Teil von der Gegenwart eines Proaktivators abhängig, nähmlich dem Praekallikrein. Beide Male gilt Kallikrein als essentiell (68).

ad 2.: endogene extravasale Aktivatoren, die Gewebsaktivatoren, werden nicht direkt an das strömende Blut abgegeben und kommen in verschiedenen Organen wie z.B. Uterus und Nieren in besonders hoher Konzentration vor. Durch Gewebetraumatisierung können sie in die Blutbahn gelangen und unter Umständen ein Hyperfibrinolyse - Syndrom auslösen. Ein Gewebeaktivator ist die in der Nierenrinde gebildete Urokinase. Sie garantiert die Freihaltung der ableitenden Harnwege und wird in der klinischen Thrombolyse - Behandlung eingesetzt (23).

ad 3.: zu den exogenen heterologen Aktivatoren gehören Streptokinase, Staphylokinase, Proteasen aus Granulozyten, in Schlangengiften enthaltene proteolytische Enzyme sowie

Pyogene und Allergene, die bei Sepsis, Leukämie u.a. Krankheitsbildern zu einer massiven Umwandlung von Plasminogen in Plasmin führen können (72).

Im extrinsic - System wird die Gerinnung nur ortsständig, d.h. ohne Beteiligung des Faktor XII, aktiviert. Durch Fibrinbildung werden Gewebsläsionen geschlossen, ohne daß die Fibrinolyse einsetzt. Im Blut beträgt der Plasminogengehalt 0,15 - 0,25 g/l mit Normalbereich 100 $\pm$ 28%, der Gesamtpool liegt bei 4,5 - 6,0 g/l. Die Halbwertszeit beträgt ca. 48 Stunden (6).

2.6. Antiplasmin

Das Fibrinolysesystem wird gegen überschießende Reaktion durch ähnliche Inhibitor - Mechanismen geschützt wie das Gerinnungssystem (Abb.4). Die proteolytische Aktivität des Plasmins wird durch Antiproteinasen gehemmt. Zu diesen zählen Antithrombin III, alpha-2- Makroglobulin, alpha-1-Antitrypsin, c1 - Esterase - Inhibitor und alpha-2-Antiplasmin. Die größte Spezifität und Affinität zu Plasmin besitzt Antiplasmin. Es bildet mit überschüssigem Plasmin irreversible Komplexe, die keine proteolytischen Eigenschaften mehr haben und über das retikulo - endotheliale System aus der Blutzirkulation entfernt werden. Antiplasmin stellt den wichtigsten und kräftigsten Inhibitor des Fibrinolyse - Systems dar, obwohl es in vitro nur 3% der gesamten Plasminkapazität zu neutralisieren vermag. Die Folge eines kongenitalen Mangels an diesem Inhibitor ist die hämorrhagische Diathese.

Die Inhibitorwirkung beruht auf einer Bindung an bestimmte Loci des Plasminmoleküls. Wenn Plasmin an Fibrin gebunden ist, sind diese Loci durch Lysingruppen besetzt, so daß dann eine Inaktivierung von Plasmin während der Thrombolyse

unmöglich ist. Eine gleiche Schutzwirkung vor Antiproteinasen über besetze Loci besteht für Lysin - Plasminogen. Als Normalbereich wird für Antiplasmin 103 ± 19% angesehen (43,54).

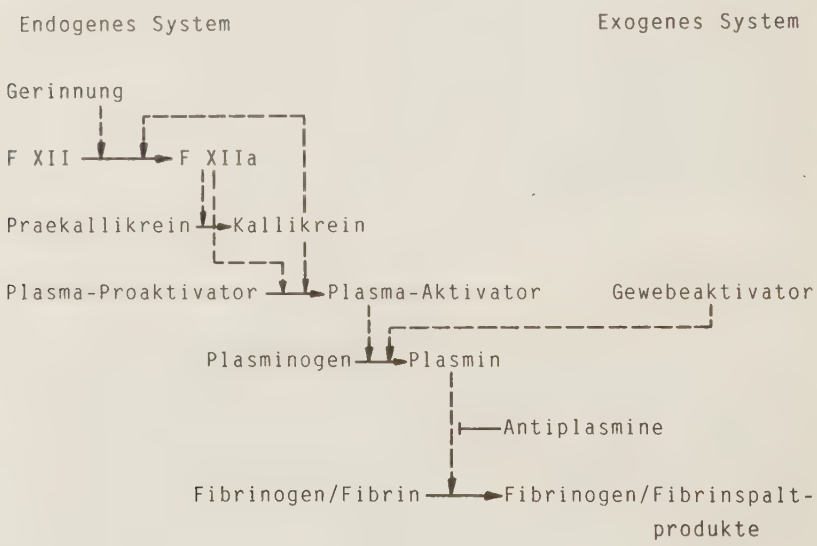


Abb.4: Modifiziertes Lysis-System (72).

2.7. Fibronektin

1948 haben Morrison et al. erstmals ein Protein als Bestandteil der Cohn - Fraktion I isoliert, das sie "cold insoluble globulin" benannten (88). Unabhängig davon wurde von anderen Autoren über Proteine berichtet, deren Eigenschaften eng verwandt sind mit denen des "cold insoluble globulin", und die heute alle als Fibronektine verstanden werden (78) (Tab.1).

Tab.1: Verschiedene Proteine mit sehr ähnlichen Eigen-

schaften und naher struktureller Verwandtschaft, die nach neueren Erkenntnissen alle Fibronektine sind (78).

Anti-gelatine-factor (AGF)
Band 1; L I band
Cell adhaesion factor (CAF)
Cell-atachement-factor (c-CAF)
Cell surface protein (CSP)
Cold insoluble globulin
Fibroblast surface antigen (SFA)
Galactoprotein A
Large, external, transformation sensitiv protein (LETS)
Major fibroblast glycoprotein
Microfibillar protein
Opsonic protein
Zeta (Z)

Fibronektin wird synthetisiert von zahlreichen Zellen, unteranderem von Fibroblasten, Epithel - und Endothelzellen, Makrophagen, Myoblasten und Hepatozyten (91). Von diesen Zellen, die alle Haftfunktionen ausüben wird es zunächst als Oberflächenprotein gebunden, dann aber als lösliches Protein an die Umgebung abgegeben (Tab.2).

Tab.2: Fibronektingehalt verschiedener Körperflüssigkeiten (50).

Flüssigkeit	Konzentration (µg/ml)
Plasma	300 (150 - 800)
Amnionflüssigkeit	170 (10 - 300)
Cerebrospinalflüssigkeit	1 - 3
Urin	ca. 100

Die Funktionen von Fibronektin variieren je nach Lokalisation. Als zellgebundenes Protein erlangt es seine

bedeutung durch die Fähigkeit, eine Verbindung zwischen Zellmembranen und einer Substratoberfläche, etwa Fibrin - oder Kollagenfibrillen, aber auch Basalmembranen, herzustellen (Tab.3).

Tab.3: Einige Funktionen von Fibronektin (50).

Funktion	Folge
Vermittelt Anhaftung und Ausbreitung von Zellen an Oberflächen (Fibrin,kollagen)	Zellform Kontaktinhibition der Bewegung Mithilfe bei Zellwanderungen Einfluß auf Zelldifferenzierung durch Zell-Matrix-Interaktionen
Vermittelt Bindung partikulärer Substrate an Zellen	Phagozytose von Bakterien und verbrauchten Blutkörperchen aus dem Kreislauf Ausschleusung von Fibrinmonomeren und denaturiertem Kollagen (Gelatine)
Assoziation mit Kollagenvorstufen	Steuerung der Fibrillogenese von Kollagen Einfluß auf Strukturbildung von Organen

Eine der ersten Beobachtungen, die das Interesse an Fibronektin weckte war, daß an der Oberfläche von virustransformierten Fibroblasten dieses Protein in wesentlich geringerer Menge vorkam als bei nicht virustransformierten (55,57).

Es besteht eine Korrelation zwischen maligner Transformation und dem Verlust von Oberflächenfibronektin (14, 18, 44). Viele maligne transformierte Zelltypen normalisieren ihr

Sozialverhalten bei ausreichendem Fibronektinangebot (1). Folglich ist der Mangel an Oberflächenfibronektin einerseits ein guter Marker maligner Transformation und andererseits von pathomechanistischer Bedeutung. Wobei leider nicht alle maligne entarteten Zellstämme einen deutlichen Mangel an Oberflächenfibronektin aufweisen (19).

Wahrscheinlich ist Fibronektin auch an der Blutgerinnung beteiligt, darauf weist hin, daß von Blutplättchen nach Kontakt mit Thrombin oder Kollagen, Fibronektin aus deren alpha-Sekretgranula bis zu 50%-ig freigesetzt wird (40, 45). Dagegen haben nichtstimulierte Plättchen kein Fibronektin auf ihren Oberfläche (73). Auch eine Beteiligung von Fibronektin an der Fibrinthrombenbildung legt sich nahe. Denn durch Faktor XIII wird die Bildung eines Co - Polymerisates zwischen Fibronektin und Fibrinogen katalysiert. Daneben katalysiert Faktor XIII die Fibronektin - Polymerenbildung (59, 89). Zudem bildet Fibronektin mit Fibrinogen Cryo - Co - Präzipitate. Hierbei wird die Mitwirkung von Thrombin oder Heparin benötigt (42,52). Wobei Fibrinogen für das heparininduzierte Cryopräzipitat entbehrlich ist (12,29). Wird das Cryopräzipitat anschließend auf 37°C erwärmt, geht Fibronektin innerhalb weniger Minuten in gelösten Zustand über (84). Beeinflußt durch Heparin wandelt sich lösliches Fibronektin in Fibrillen um. Auf der Suche nach einer Erklärung dafür, daß

Fibronektin einerseits in löslicher Form im Plasma und andererseits an Zelloberflächen in fibrillärer Form gefunden wird, wurde eine Modellvorstellung entwickelt (50). Dieses Modell geht von zwei Untereinheiten des Fibronektin - Monomers aus, die wiederum jeweils über einen Satz komplementärer Bindungsstellen verfügen (51). Eine Vervollständigung der Aufklärung über die Struktur von Fibronektin (11,60), das ein Molgewicht von ca. 400000 hat, würde zur Verifizierung oder Falzifizierung des Modells

beitragen (41,47). Im löslichen Material sättigen sich diese Bindungen intramolekular ab. Angeregt durch Heparin oder andere ionische Agentien, die sich an die Bindungszentren oder an Nachbarstrukturen anlagern, aber auch durch Temperatursenkung oder sogar spontan nach Kontakt mit Oberflächen (50) entsteht über eine Zwischenstufe der fibrilläre Zustand. Im fibrillären Material sättigen sich die Bindungsstellen intermolekular ab. Heparin und vermutlich auch Heparansulfat verbessern auf diese Weise die Affinität von Fibronektin zu Zelloberflächen. Plasma - Fibronektin stellt demnach einen Reservepool dar, für den Fall, daß die Eigenleistung einer Zelle nicht ausreicht. Die Bedeutung dessen wird klar, wenn man betrachtet, daß nach Operativen Eingriffen, schweren Traumen oder bei einer disseminierten intravaskulären Gerinnung ein Abfall von Fibronektin im Blut eintritt, was auf einen Verbrauch bei Entfernung von zirkulierendem Fibrin schließen läßt. Bei der Abräumung von denaturiertem Kollagen durch Makrophagen wirkt Fibronektin als Opsonin mit (56, 85). Hilfreich ist hierbei, daß denaturiertes besser als natives Kollagen von Fibronektin gebunden wird (27).

Ein Abfall des Plasma - Fibronektinspiegels wird auch nach einer Blockade des retikulo - endothelialen Systems (RES) durch injizierte Kolloide, aber auch nach septischem und kardiogenem Kreislaufschock beobachtet (15,70). Fibronektin ist also an einem umfangreichen System zellulärer Funktionen beteiligt. Es wirkt, indem es sich an die Zelmembranaußenseite anlagert und kraft seiner Affinität zu Matrixsubstanzen wie Kollagen - oder Fibrinfibrillen, eine Zell - Matrix - Wechselwirkung vermittelt. Gesteuert wird diese Funktion offenbar durch Glykosaminoglykane an der Zellwand und in deren Nahbereich, wobei Heparansulfat die Affinität von Fibronektin zu Zellen und Matrixsubstanzen verbessert, wohingegen Hyaluronsäure sie abschwächt (61). Nach onkogener Transformation von Zellen gerät dieses System

erheblich aus dem Gleichgewicht.

3. Material und Methoden

3.1. Probanden

Welche freiwillig spendebereite Person Blutspender werden kann, ist exakt charakterisiert in den "Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion" (17). Ein Spender muß das 18. Lebensjahr vollendet haben und soll nicht älter als 65 Jahre sein. Gründe für den Ausschluß von der Blutspende sind: aktive Tuberkulose, Astma bronchiale, Blutkrankheiten, Brucellose, Dauerausscheider von Typhus - und Paratyphus - Erregern oder Ausscheidung anderer Salmonellen, Diabetes mellitus unter Insulin - Therapie, HBs - Antigen - Persistenz, Hepatitis, AIDS - Virusträger, Lues, Malaria, Rikettsiosen, sonstige chronische Krankheiten, Alkohol - und/oder Drogenabusus, Dauermedikation. Gesundheit und Wohlbefinden des Spenders dürfen nicht beeinträchtigt werden. Darüberhinaus kann die Rückstellung ausgesprochen werden auf Grund von Impfungen, Umgebungsinfektionen und aus verschiedenen anderen Gründen wie Schwangerschaft, Geburt und Fehlgeburt, Zahnextraktion, Tätowierung, Akupunktur und nach Rückkehr aus einem infektionsgefährdetem Gebiet. Der Spendewillige soll einer gesundheitlichen Untersuchung unterzogen werden. Zur Feststellung der Spendetauglichkeit erfolgt die Untersuchung auf Lues und Hepatitis, die Kontrolle von Temperatur, Blutkörperchen - Senkungsgeschwindigkeit, Urin und Röntgenthorax (in zweijährigen Abständen). Zur Einholung von Auskünften beim Gesundheitsamt muß das Einverständnis des Spenders vorliegen. Die Blutgruppe des Spenders muß bestimmt werden (10,17). Für diese Arbeit wurden fünfzig tiefgefrorene Frischplasmen von fünfzig Spendern untersucht. Die handelsüblichen Präparate stammten von den Universitäts - Blutbanken Tübingen, Freiburg und Göttingen.

3.2. Materialien

3.2.1. Klinische Materialien

Die Blutabnahme erfolgte mit Hilfe eines Fenwal® Doppelbeutels, zusammengesetzt aus einem Blutbeutel mit Einstichdorn, der 75ml ACD - Adenin Stabilisator enthält und einem Transfusionsbeutel, den die TRAVENOL GmbH, München, BRD herstellt.

Gelagert wird das GFP im Biopack®P Leerbeutel der Firma BIOTEST PHARMA, Dreilich, BRD.

Die Zentrifuge Typ: UJ IV KS wurde von HERAEUS - CHRIST GmbH, Osterode, BRD hergestellt.

Die Kühltruhe stammt von BOREAS, SO - LOW ENVIRONEMENTAL EQUIPMENT CO., Cincinnati, Ohio USA.

3.2.2. Labor - Materialien

Die photometrischen Bestimmungen wurden mit einem Filter - Photometer Typ PL4 der Firma ZEISS, Oberkochen, BRD durchgeführt.

Es wurden Quarz - Halbmikroküvetten der MULTIMED WINKLER & LÖSCHER GmbH, Kirchheim u. Teck, BRD verwendet.

Von der Firma GREINER, Nürtingen, BRD kamen die PS 17/100mm Plastik - Einweg - Röhrchen.

Das Aqua destillata, Ampuwa , wurde von der FRESENIUS AG, Bad Homburg, BRD geliefert.

Als Standartplasma wurde das Humannormal Plasma, Coattest , der Firma AB KABI DIAGNOSTIKA, Stockholm, Schweden benutzt.

Die Dr. R. WOBSTER KG, Lauda, BRD, hat das Wasserbad Typ D8/17 hergestellt.

Die Bestimmung von Praekallikrein, Kallikrein, Plasminogen und Antiplasmin erfolgte mittels chromogener Substrate.

Zur Bestimmung der Plasmaaktivität von Praekallikrein wurden der Plasma Praekallikrein Aktivator und das Substrat S-2302 der Firma AB KABI DIAGNOSTIKA Stockholm, Schweden verwendet.

Um die Kallikrein - ähnliche Aktivität im Plasma bestimmen zu können, wurde ebenfalls das Subsrtat S-2302 benötigt.

Die Aktivität von Plasminogen im Plasma wurde mit Hilfe des Substrates S-2251 und der Streptokinase (Kabinase) als Aktivator der Firma AB KABI DIAGNOSTIKA, Stockholm, Schweden ermittelt.

Der Kit zur photometrischen Bestimmung von Antiplasmin im Plasma stammte von der DEUTSCHEN KABI GmbH, München, BRD, darin ist ebenfalls das Substrat S-2251 enthalten.

Zur quantitativen Bestimmung von Fibronektin im Plasma wurde ein turbidimetrischer Immuno - Assay der BOEHRINGER MANNHEIM GmbH, Mannheim, BRD eingesetzt.

3.3. Methoden

3.3.1. Klinische Methoden

Zur Herstellung von gefrorenem Frischplasma vorgesehenes Blut soll grundsätzlich in Doppelbeutel abgenommen werden, die sofort nach der Entnahme im Kühlschrank gelagert werden. Zwischen Blutentnahme und Beginn der GFP - Bereitung soll nicht mehr als eine Stunde vergehen. Die erste

Zentrifugation erfolgt bei +18°C für 15 min und 2000 U/min. Das überstehende thrombozytenreiche Plasma wird mit einer Quetsche in den Satellitenbeutel gepreßt. Nach Abtrennung des Satellitenbeutels erfolgt die zweite Zentrifugation bei +18°C für 15 min und 3000 U/min. Mittels Quetsche wird das zellfreie Plasma in einen dritten Beutel übertragen. Die Plasmapräparationen werden zunächst ohne Kartonumhüllung bei -80°C in einer speziellen Tiefkühltruhe gelagert. Zur Aufbewahrung werden die eingefrorenen Frischplasmabeutel in Pappschachteln eingeschoben und nach Blutgruppen geordnet in Kühlschränken mit -30°C einsortiert (4,75,94).

3.3.2. Labor-Methoden

3.3.2.1. Praekallikrein (20,65)

Testprinzip:

Faktor XII wird angeregt durch einen Kontaktaktivator. Kallikrein wird daraufhin durch Faktor XIIa und high molekular weight (HMW). Kininogen aus Praekallikrein freigesetzt. Das so gebildete Kallikrein katalysiert die Abspaltung von p - Nitroanilin (pNA) von chromogenem Substrat. Diese Reaktion wird nach einer festgelegten Zeit durch Essigsäure gestoppt. Die entstandene Farbstoffmenge wird bei 405nm photometrisch bestimmt. Mit Hilfe der Extinktion wird nun im Vergleich mit einem Normalkollektiv der Gehalt an Praekallikrein im Plasma ermittelt.

Reaktionsschritte:

1. FXII $\xrightarrow{\text{Kontaktaktivierung}}$ FXIIa
2. Praekallikrein $\xrightarrow{\text{FXIIa+HMW-Kininogen}}$ Kallikrein
3. H-D-Pro-Phe-Arg-pNA+H_2O $\xrightarrow{\text{Kallikrein}}$ H-D-Pro-Phe-Arg-OH+pNA

Reagenzien:

a)Substrat:
25 mg Substrat S-2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNAxHCl) werden in 20 ml destilliertem Wasser gelöst. Die 2 mmol/l Lösung ist bei +2 bis +8 °C ca. sechs Monate haltbar.
b)Plasma Praekallikrein Aktivator
Zur Substanz werden 5 ml destillierten Wassers gegeben. Bei +2 bis +8 °C beträgt die Haltbarkeit einen Tag, bei Raumtemperatur wenige Stunden.
c)Puffer-Lösung
6,1 g Tris und 800 ml Aqua destillata werden bei +25 °C durch Zugabe von 1 mol/l HCl auf pH 7,8 titriert. Dann wird mit Aqua destillata auf 1 Liter aufgefüllt. Bei Temperaturen von +2 bis +8 °C ist der Puffer sechs Monate haltbar.
d)50%-ige Essigsäure

Probenbereitung:

Zur Erstellung einer Eichkurve wird eine Verdünnungsreihe mit Human-normal-Plasma hergestellt (siehe Tab.4).

Tab.4: Verdünnungsreihe zur Erstellung einer Praekallikrein-Eichkurve.

Praekallikrein (%)	Normal Plasma (µl)	Puffer (µl)
25	100	300
50	200	200
75	300	100
100	400	-
125	50	2400

Danach werden von jeder Verdünnung 50 µl mit 3000 µl Puffer vermischt. Eine Ausnahme bildet hier die 125% Verdünnung,

die in den Test direkt eingesetzt wird. So erhält man eine Eichkurve zwischen 25 und 125% der Norm.

Auch vom Testplasma werden 50 µl mit 300 µl Puffer verdünnt.
Testdurchführung:

Bei der Endpunktmethode werden nach 4-minütiger Vorinkubation im Wasserbad bei +37 °C von 200 µl Plasma Praekallikrein Aktivator 200 µl Plasmaverdßnnung zugefügt, gemischt und weitere 2 Minuten bei +37 °C inkubiert. Hierzu pipettiert man 200 µl Substrat S-2302 und mischt sofort. Nach exakt 120 Sekunden inkubieren stoppen 200 µl 50%-ige Essigsäure die Reaktion. Parallel zu jeder Plasmaprobe wird ein Leerwert benötigt. Dieser wird in umgekehrter Reihenfolge mit den gleichen Reagenzien pipettiert und nicht inkubiert. Die Extinktionsdifferenz zwischen Leerwert und Plasmaprobe wird bei 405 nm photometrisch bestimmt. Die Färbung ist höchstens 4 Stunden stabil. Mit Hilfe von Extinktion und Eichkurve wird nun der Gehalt an Praekallikrein im Plasma ermittelt.

3.3.2.2. Kallikrein (63,79)

Testprinzip:

Die dem Plasmakallikrein entsprechende Aktivität katalysiert die Spaltung des p-Nitroanilin (pNA) vom Substrat H-D-Pro-Phe-Arg-PNA.

$$\text{H-D-Pro-Phe-Arg-pNA} + H_2O \xrightarrow{\text{Kallikrein-like-aktivity}} \text{H-D-Pro-Phe-Arg-OH} + \text{pNA}$$

In der Endpunktmethode wird die Reaktion durch 50%-ige Essigsäure gestoppt. Die entstandene Farbstoffmenge wird bei 405nm photometrisch bestimmt. Mit Hilfe der Extinktion und eines Umrechnungsfaktors wird nun der Gehalt an Kallikrein ähnlicher Aktivität ermittelt.

Reagenzien:

a)Substrat:
25 mg Substrat S-2302 werden in 20 ml Aqua destillata gelöst. Die 2 nmol/l Lösung ist bei +2 bis +8 °C ca. sechs Monate haltbar.
b)Puffer-Lösung:
Es werden bei +25 °C 6,1g Tris (50 mmol/l) 6,6 g NaCl (113 mmol/l) und 800 ml Aqua destillata durch Zugabe von 1 mol/l HCl auf pH 7,8 titriert. Dann wird mit Aqua destillata auf 1 Liter aufgefüllt. Der Puffer ist bei Temperaturen von +2 bis +8 °C sechs Monate haltbar.
c)50%-ige Essigsäure

Probenbereitung:

100 µl Testplasma werden mit 1000 µl Puffer vermischt.

Testdurchführung:

Bei der Endpunktmethode werden 200 µl Plasmaverdünnung bei +37 °C Wasserbadtemperatur drei bis vier Minuten erwärmt. Hierzu pipettiert man 200 µl Substrat S-2302 und mischt sofort. Nach exakt zehn Minuten Inkubation stoppen 200 µl 50%-ige Essigsäure die Reaktion. Parallel zu jeder Probe wird ein Leerwert benötigt. Dieser wird in Umgekehrter Reihenfolge mit den gleichen Reagenzien pipettiert und nicht inkubiert. Die Extinktionsdifferenz zwischen Leerwert und Plasmaprobe wird bei 405 nm photometrisch bestimmt. Die Färbung ist höchstens vier Stunden stabil. Mit Hilfe eines angegebenen Umrechnungsfaktors (63) wird der Gehalt an Kallikrein ähnlicher Aktivität im Plasma ermittelt: µkat/l=Ex5,73 oder U/l=Ex344.

3.3.2.3. Plasminogen (7,39,64)

Testprinzip:

Gibt man zu Human-Plasma, das Plasminogen enthält, einen Überschuß an Streptokinase, so entsteht ein Plasminogen-Streptokinase-Komplex mit enzymatischer Aktivität. Dieser Komplex katalysiert die Spaltung von p-Nitroanilin vom Substrat H-D-Val-Leu-Lys-pNA.

$$\text{Plasminogen} + \text{Sreptokinase} \longrightarrow \text{Plg-Sk-Komplex}$$

$$\text{H-D-Val-Leu-Lys-pNA} + H_2O \xrightarrow{\text{Plg-Sk-K}} \text{H-D-Val-Leu-Lys-OH} + \text{pNA}$$

Kommt es durch einen Überschuß an Streptokinase zur Komlexbildung, so bleibt kein freies Plasminogen, um Plasmin entstehen zu lassen. In dieser Situation ist die enzymatische Aktivität von plasmininhibitoren unbehindert. Folglich entspricht das entstandene pNA dem Gehalt an Plasminogen. Bei der Endpunktmethode stoppt 50%-ige Essigsäure die Reaktion nach definierter Zeit. Die Farbentwicklung wird bei 405 nm photometrisch bestimmt. Mit Hilfe der Extinktion wird im Vergleich mit einem Normalkollektiv der Gehalt an Plasminogen ermittelt.

Reagenzien:

a)Substrat:
25 mg Substrat S-2251 werden in 15 ml Aqua destillata gelöst. Die Lösung ist bei +2 bis +8 °C sechs Monate haltbar.
b)Aktivator:
Streptokinase wird mit 10 ml Aqua destillata auf eine Konzentration von 10000 IU/ml verdünnt. Die Lösung ist bei +2 bis +8 °C höchstens eine Woche haltbar.
c)Puffer:
6,1 g Tris (50 mmol/l) und 7g NaCl (12 mmol/l) werden mit 800 ml Aqua destillata durch Zugabe von 1 mol/l HCl bei +25 °C auf pH 7,4 titriert. Dann wird mit Aqua destillata auf 1 Liter aufgefüllt. Der Puffer ist bei +2 bis +8 °C zwei Monate haltbar.

d)Substrat-Puffer-Lösung:
Substratlösung und Puffer werden im Verhältnis 2:5 vermengt. Diese Lösung ist bei +20 bis +25 °C drei Tage haltbar.
e)50%-ige Essigsäure

Probenbereitung:

Mit Human Normal Plasma wird eine Verdünnungsreihe erstellt, um eine Eichkurve zu erhalte (siehe Tab.5).

Tab.5: Verdünnungsreihe zur Erstellung einer Plasminogen-Eichkurve.

Plasminogen (%)	Normal Plasma (µl)	Puffer (µl)
25	100	300
50	200	200
75	300	100
100	400	-

Danach werden von jeder Verdünnung 50 µl mit 200 µl Puffer vermischt. Auch vom Testplasma werden 50 µl mit 200 µl Puffer verdünnt.

Testdurchführung:

Zu 200 µl Plasmaverdünnung werden nach 5-minütiger Vorinkubation im Wasserbad bei +37 °C 100 µl Streptokinaselösung zugefügt, gemischt und weitere 10 Minuten inkubiert. Wenn hierzu 700 µl Substrat-Pufferlösung pipettiert sind, muß sofort gemischt werden. Nach exakt 180 Sekunden Inkubation stoppen 100 µl 50%-ige Essigsäure die Reaktion. Der Leerwert besteht aus 200 µl Plasmaverdünnung, 100 µl 50%-ige Essigsäure und 800µl Aqua destillata. Die Extinktionsdifferenz zwischen Leerwert und Probe wird bei

405 nm photometrisch gemessen. Die Färbung ist höchstens 4 Stunden stabil. Mit Hilfe von Extinktion der Plasmaprobe und der Eichkurve wird nun der Gehalt an Plasminogen ermittelt.

3.3.2.4. Antiplasmin (30,37,62)

Testprinzip:

Inkubiert man bei +37 °C verdünntes Plasma, das Antiplasmin enthält und gibt einen Überschuß an Plasmin (Pl) dazu, dann wird innerhalb von 20 Sekunden eine dem Antiplasmin proportionale Plasminmenge inhibiert. Die nicht inhibierte Plasminmenge spaltet p-Nitroanilin vom chromogenen Substrat H-D-Val-Leu-Lys-pNA ab.

$$\text{Antiplasmin} + \text{Pl(Überschuß)} \longrightarrow \text{APl-Pl-Komplex} + \text{Pl(Rest)}$$

$$\text{H-D-Val-Leu-Lys-pNA} + H_2O \xrightarrow{\text{Pl(Rest)}} \text{H-D-Val-Leu-Lys-OH} + \text{pNA}$$

Bei der Endpunktmethode wird die Reaktion durch Zugabe von Essigsäure nach einer bestimmten Zeit unterbrochen. Die Farbentwicklung wird bei 405nm photometrisch bestimmt. Die unbekannte Antiplasmin - Konzentration ermittelt man mit den Gleichungen von Eichkurven, erstellt aus bekannten Antiplasmin - Konzentrationen.

Reagenzien:

a)Substrat:
19 mg lyophilisiertes Substrat S-2251 werden in 10 ml Aqua destillata gelöst. Die 3,5 mmol/l Lösung ist bei +2 bis +8 °C sechs Monate haltbar.
b)Plasmin-Solvent:
Sterile Lösung von Glycerin + HCl 2 mmol/l, im Verhältnis 1:1. Die Begrenzung der Haltbarkeit ist im Ablaufdatum angegeben.
c)Plasmin:

22 nkat lyophilisiertes humanes Plasmin werden mit 10 ml Plasmin - Solvent gelöst. Die Lösung ist bei +2 bis +8 °C einen Monat haltbar und sollte vor Gebrauch mindestens eine Stunde bei +25 °C erwärmt werden.

d)Puffer:

75 ml steriler Tris - Puffer (0,0 5mol/l, pH 7,4) sind gebrauchsfertig im Kit enthalten und bis zum aufgedruckten Ablaufdatum haltbar.

e)Humanes Normal-Plasma:

Das lyophilisierte Plasma wird mit 1 ml Aqua destillata gelöst. Die Plasmalösung ist bei +2 bis +8 °C eine Woche haltbar.

Probenbereitung:

Aus 500 µl Normal - Plasma und 1900 µl Puffer wird eine Vorverdünnung hergestellt. Für die Eichkurve wird eine Verdünnungsreihe nach Tab.6 erstellt.

Tab.6: Verdünnungsreihe zur Erstellung einer Antiplasmin-Eichkurve.

Antiplasmin (%)	Vorverdünnung (µl)	Puffer (µl)
0	0	2500
25	100	2400
50	200	2300
75	300	2200
100	400	2100
125	500	2000

Vom Testplasma mischt man 100 µl mit 2900 µl Puffer, der +25 °C Raumtemperatur haben sollte.

Testdurchführung:

Zu 600 µl Testplasmaverdünnung werden nach 5-minütiger Vorinkubation im Wasserbad bei +37 °C 200 µl Plasmin zugefügt und gemischt. Nach exakt 20 Sekunden bei +37 °C werden 200 µl Substrat S-2251 hinzupipettiert und gemischt. Nach weiteren genau 120 Sekunden Inkubation bei +37 °C stoppen 100 µl 50%-ige Essigsäure die Reaktion. Die Extinktion der Probe wird gegen den Leerwert, der 600 µl Testplasma, 100 µl 50%-ige Essigsäure und 400 µl Aqua destillata enthält, bei 405 nm photometrisch gemessen. Die Farbe bleibt ca. 4 Stunden stabil. Die Extinktion der Plasmaprobe und die Gleichung der Eichkurve werden zur Ermittlung der Antiplasmin - Konzentration verwendet. Als Qualitätskontrolle werden täglich je eine 25% und eine 100% Verdünnung mitbestimmt.

3.3.2.5. Fibronektin

Testprinzip:

Der hier verwendete kommerzielle Test ist ein turbidimetrischer Immuno Assay. Bei diesem Test führt eine Antigen - Antikörper Reaktion zu einer Trübung, die nach einer exakt definierten Zeit bei 340nm photometrisch bestimmt wird. Ausgewertet wird gegen eine, zu jeder Meßserie neu erstellten Bezugskurve.

Reagenzien:

a)Antiserum:
Die dem Test - Kit entnommene Antiserumlösung wird mit zehn Teilen des fertig mitgelieferten Puffers verdünnt. Diese Lösung ist bei +4 °C sieben Tage stabil.
b)Fibronektinstandards:
Fibronektinstandardlösungen zwischen 0 und 1000 µg/ml werden

dem Test - Kit entnommen. Sie werden direkt im Test verwendet. Eine Kontrollösung mit 200 µg/ml, die gleichfalls dem Test - Kit zu entnehmen ist, wird ebenso direkt in den Test eingesetzt.

Testdurchführung:

Die Reaktion wird in einer Küvette, die im Photometer steht vorgenommen. Hierzu werden 1000 µl der Antiserumverdünnung in der Küvette vorgelegt. Sofort nach dem 10 µl des zu testenden Probandenplasmas zugefügt sind, wird mit einem Einmal - Rührspatel durchgemischt. Nach exakt 60 Sekunden wird das erste Mal, nach genau 10 Minuten das zweite Mal die Extinktion abgelesen. Die Extinktionsdifferenz dieser beiden Messungen wird mit Hilfe der Eichkurve ermittelt.

3.3.3. Statistische Methoden

Zu jedem Reagenzienansatz wird mit Hilfe einer Normal - Plasma Verdünnungsreihe zwischen 25 und 125% des jeweils zu bestimmenden Parameters eine Eichkurve erstellt. In die Kurvengleichung, die als Ordinate die Extinktion und als Abszisse die zugehörige Parameterkonzentration angibt, werden die Extinktionen der mit diesem Reagenzienansatz durchgeführten Bestimmungen eingesetzt und so die entsprechenden Parameterkonzentrationen errechnet. Die Konzentrationsangaben können nun, auch wenn sie aus unterschiedlichen Reagenzienansätzen stammen, mit einander verglichen und gemeinsam interpretiert werden.

Für die Beratung und Hilfestellung bei der statistischen Bearbeitung danke ich Frau Pietsch - Breitfeld, die am Institut für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen tätig ist.

4. Ergebnisse

Die gefrorenen Frischplasmen werden in drei Gruppen nach den Herstellungsorten Tübingen, Freiburg und Göttingen eingeteilt. Die Aktivität der bereits vorgestellten Gerinnungsfaktoren Praekallikrein, Kallikrein, Plasminogen, Antiplasmin und Fibronektin wurden hinsichtlich ihrer Abhängigkeit vom Herstellungsort untersucht. Dann wurden die gefrorenen Frischplasmen in vier Gruppen gemäß den Blutgruppen A, B, AB und 0 eingeteilt und hinsichtlich einer Abhängigkeit von der Blutgruppenzugehörigkeit untersucht. Um die Bestimmungen aus den verschiedenen Reagenzienansätzen gleich behandeln zu können, wurde von jedem Ansatz eine Eichkurve erstellt und die dazugehörigen Konzentrationen damit berechnet (siehe 3.3.3.) Als Bezugswerte dienten, die von der Arbeitsgruppe Prof. Heller Universität Tübingen ermittelten Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren in nicht eingefrorenem Frischplasma, welches von 22 gerinnungsphysiologisch gesunden, nicht blutspendenden Probanden gewonnen wurde.

4.1. Praekallikrein

Zu jedem Reagenzienansatz wurde eine Eichkurve ermittelt. Hierzu wurde von lyophilisiertem gepoolten Normalplasma eine Verdünnungsreihe zwischen 25% und 125% erstellt (siehe auch Material und Methoden).

Tab.7: Praekallikrein Eichkurve

Konzentration	h	$\bar{E}$
25%	4	0,05475
50%	4	0,1035
75%	4	0,1565

100%	4	0,223875
125%	4	0,252666

Mit Hilfe der Extinktionen und der bekannten Verdünnungsgrade wurden nach der Grundgleichung y=mx+c, wobei die Ordinate für die Extinktion und die Abszisse für den Verdünnungsgrad steht, die Geradengleichungen errechnet (Tab.8, Abb.5).

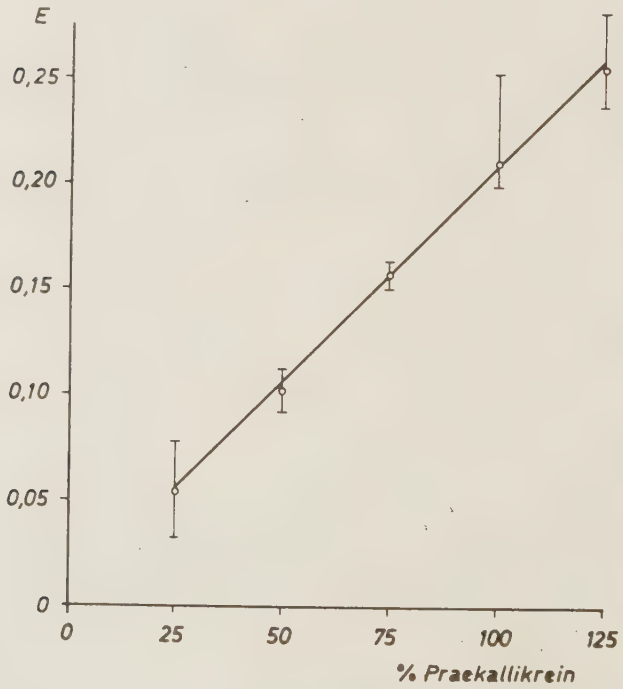


Abb.5: Praekallikrein Gesamteichkurve

Tab.8: Praekallikrein Gesamteichkurve

Gleichung 1: y = 0,002x + 0,006
Gleichung 2: y = 0,002x + 0,000

Gleichung 3: y = 0,002x - 0,007
Gleichung 4: y = 0,002x + o,oo1
Gesamtgleichung : y = 0,002x + 0,002

a)Vergleich der Herstellungsorte:
Die Praekallikreinbestimmungen aller Plasmen (n=50) ergab einen Gesamtdurchschnittswert von 128% (s=21,8). Nach Herstellungsorten aufgegliedert erhält man für Tübingen (n=21) ein Durchschnittswert von 134% (s=18,7), für Freiburg (n=21) 120% (s=26) und für Göttingen (n=8) 135% (s=20). Die Bezugsbestimmungen (n=22) ergaben einen Durchschnittswert von 95% (s=27,7). Im Vergleich zur Bezugsgruppe, deren Frischplasmen nicht eingefroren worden waren, sind die Praekallikrein - Aktivitäten der gefrorenen Frischplasmen erhöht. Wobei die Aktivität der Freiburger GFP weniger erhöht ist, als die der GFP aus Tübingen und Göttingen (Abb.6).

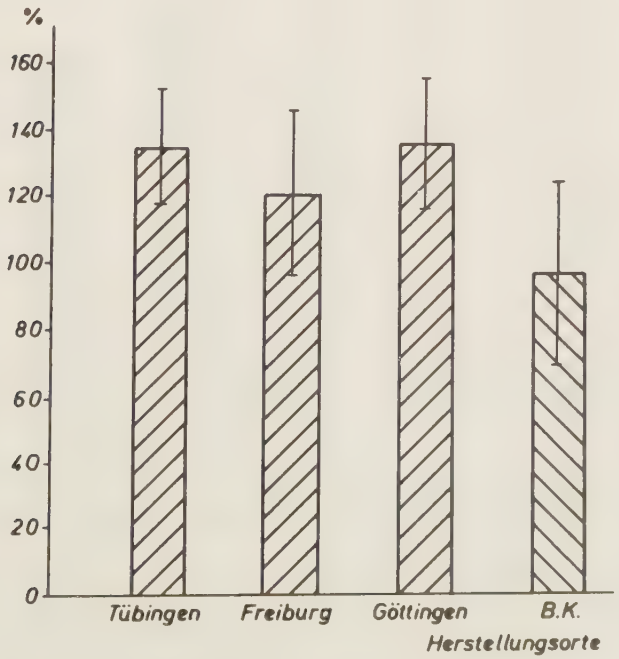


Abb.6: Herstellungsorte Praekallikrein

b)Vergleich der Blutgruppen:
Für alle gefrorenen Frischplasmen (n=47) wurde ein gemeinsamer Mittelwert von 127% (s=23) ermittelt. Die Aufgliederung gemäß der Blutgruppenzugehörigkeit ergab für die Blutgruppe A (n=19) eine durchschnittliche Aktivität von 131% (s=25,6), für Blutgruppe B (n=7) 119% (s=12), für Blutgruppe AB (n=14) 130% (s=13,8) und für Blutgruppe 0 (n=7) 121% (s=39). Entsprechend des Aktivitätsdurchschnitts der Bezugsgruppe (n=22) mit 95% sind die Werte der Blutgruppen A und AB stärker erhöht als die der Gruppen B und 0 (Abb.7).

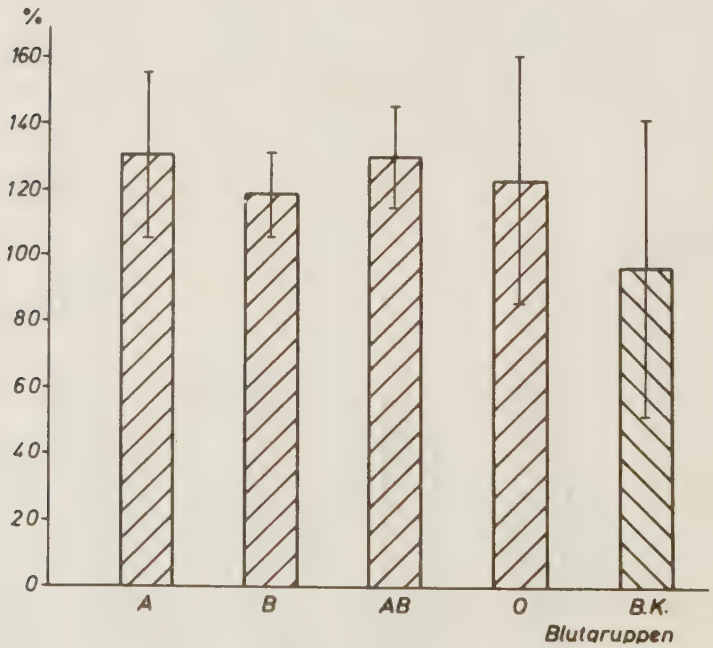


Abb.7: Blutgruppen Praekallikrein

4.2. Kallikrein

a)Vergleich der Herstellungsorte

Der Durchschnittswert des Gehaltes an Kallikreinähnlicher Aktivität beläuft sich auf 0,30752 µkat/l (s=0,10), wenn man alle Plasmen (n=50) zusammennimmt. Die Gruppe der Tübinger gefrorenen Frischplasmen (n=21) erreichte einen Mittelwert von 0,35147 µkat/l (s=0,12), die Freiburger GFP (n=21) 0,27214 µkat/l (s=0,10) und die Göttinger GFP (n=8) 0,285 µkat/l (s=0,02). Der durchschnittliche Kallikreingehalt der Bezugsgruppe (n=22) ist 0,1973 µkat/l (s=0,10).

Die Tübinger GFP weisen also den höchsten Kallikreinähnlichen Gehalt auf, wohingegen die Freiburger dem Wert der Frischplasmen am nächsten sind, direkt gefolgt von den Göttingern (Abb.8).

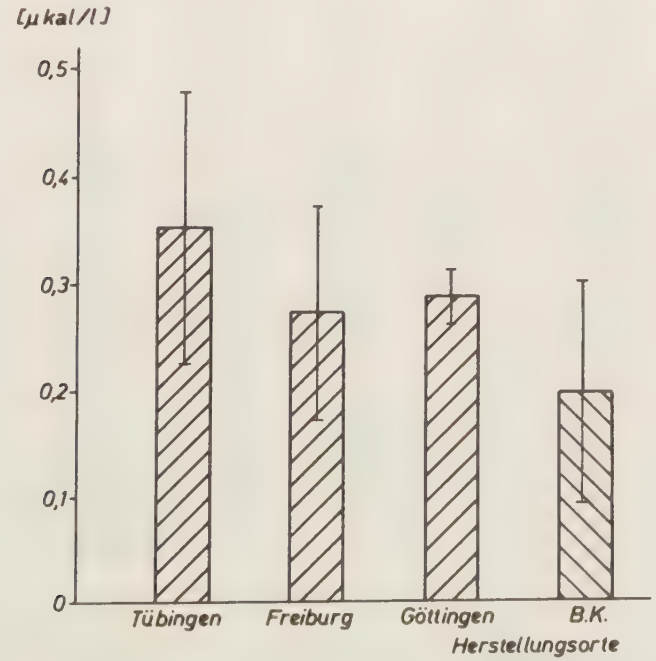


Abb.8: Herstellungsorte Kallikrein

b)Vergleich der Blutgruppen

Der Mittelwert an Kallikrein aller GFP (n=47) ist 0,31289 µkat/l (s=0,11). Er setzt sich zusammen aus Blutgruppe A (n=19) mit 0,34178 µkat/l (s=0,15), Blutgruppe B (n=7) mit 0,25657 µkat/l (s=0,06), Blutgruppe AB (n=14) mit 0,33193 µkat/l (s=0,12) und Blutgruppe 0 (n=7) mit 0,25271 µkat/l (s=0,10).

Die Werte der Blutgruppe A und AB liegen eng zusammen und höher als die fast identischen Werte der Blutgruppen B und

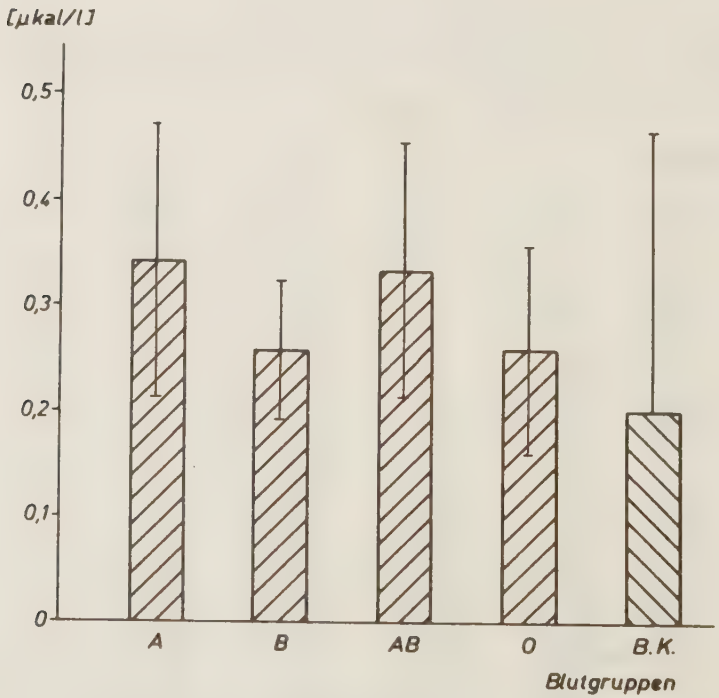


Abb.9: Blutgruppen Kallikrein

0. Die Kallikreinmittelwerte aller Blutgruppen liegen deutlich über dem für die Kontrollgruppe ermittelten Wert,

wobei Blutgruppe A und AB eine Mittelwerterhöhung um mehr als das Doppelte erfahren haben als die Gruppen B und 0 (Abb.9).

4.3. Plasminogen

Aus lyophilisiertem gepooltem Normalplasma wurde eine Verdünnungsreihe zwischen 25% und 100% erstellt und für die Eichkurvenermittlung verwendet (Tab.9).

Tab.9: Plasminogen Eichkurven

Konzentration	h	E
25%	4	0,098375
50%	4	0,2005
75%	4	0,313875
100%	4	0,417625

Die gemessenen Extinktionen und deren zugehörige Verdünnung wurden benutzt, um die bestmögliche Geradengleichung jeder Eichkurve nach der Grundgleichung $y = mx + c$ zu berechnen (Tab.10, Abb.10).

Tab.10: Geradengleichungen der Plasminogen Eichkurven.

Gleichung 1: $y = 0{,}004x - 0{,}054$
Gleichung 2: $y = 0{,}004x + 0{,}006$
Gleichung 3: $y = 0{,}004x + 0{,}016$
Gleichung 4: $y = 0{,}004x - 0{,}008$
Gesamtgleichung : $y = 0{,}004x - 0{,}010$

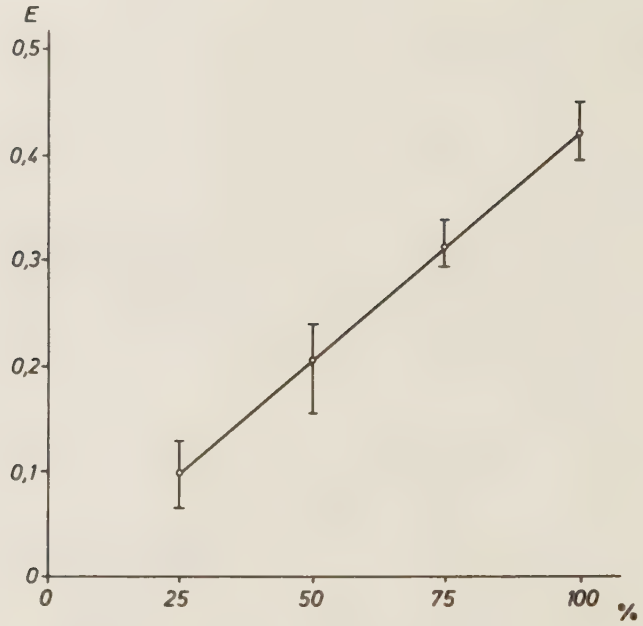


Abb.10: Plasminogen Gesamteichkurve

a)Vergleich der Herstellungsorte

Nimmt man die Plasminogenbestimmungen aller Plasmen (n=50) zusammen, so erhält man einen Durchschnittswert von 92% (s=17,1). Die Tübinger GFP (n=21) enthalten durchschnittlich 95% (s=17,9) Plasminogen, die Freiburger (n=21) 88% (s=16,5) und die Göttinger (n=8) 92% (s=18,5). Die gefrorenen Frischplasmen haben also eine niedrigere Plasminogen - Aktivität als die Bezugsgruppe (n=22) mit 103% (s=19,9), wobei sich der %-Gehalt an Plasminogen der Freiburger GFP weiter vom Wert der nicht gefrorenen Frischplasmen entfernt als die der Werte aus Göttingen und Tübingen (Abb.11).

b)Vergleich der Blutgruppen

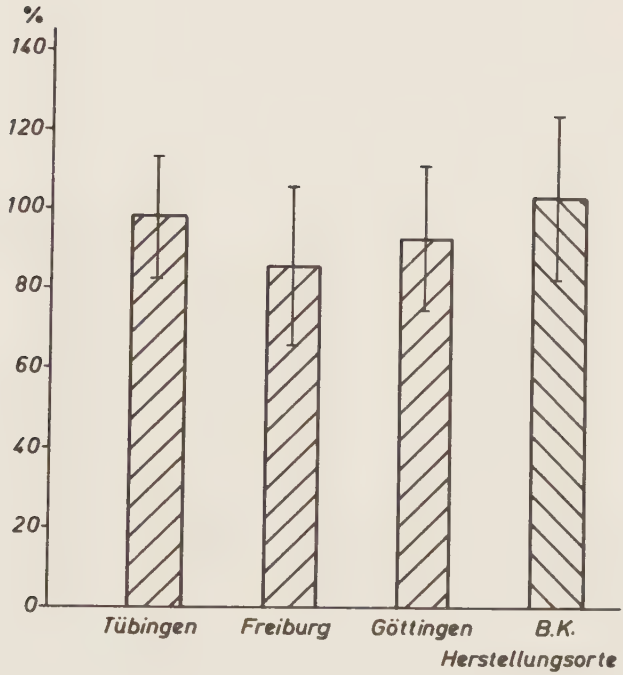


Abb.11: Herstellungsorte Plasminogen

Auf 92% (s=17,5) beläuft sich der Plasminogengehalt, wenn man alle gefrorenen Frischplasmen (n=47) gemeinsam betrachtet. 95% (s=20,7) sind von der Blutgruppe A (n=19), 83% (s=15,8) von B (n=7), 94% (s=12,9) von AB (n=14) und 90% (s=15,7) von der Blutgruppe 0 (n=7). Also liegt die Prozentzahl der nicht gefrorenen Frischplasmen (n=22) mit 103% über denen der gefrorenen Frischplasmen. Die Blutgruppe B erreicht nur den niedrigsten Aktivitätsdurchschnitt, gefolgt von der Gruppe 0. Dagegen sind die Prozentzahlen der Blutgruppen AB und A näher dem Kontrollwert und eng beieinanderliegend (Abb.12).

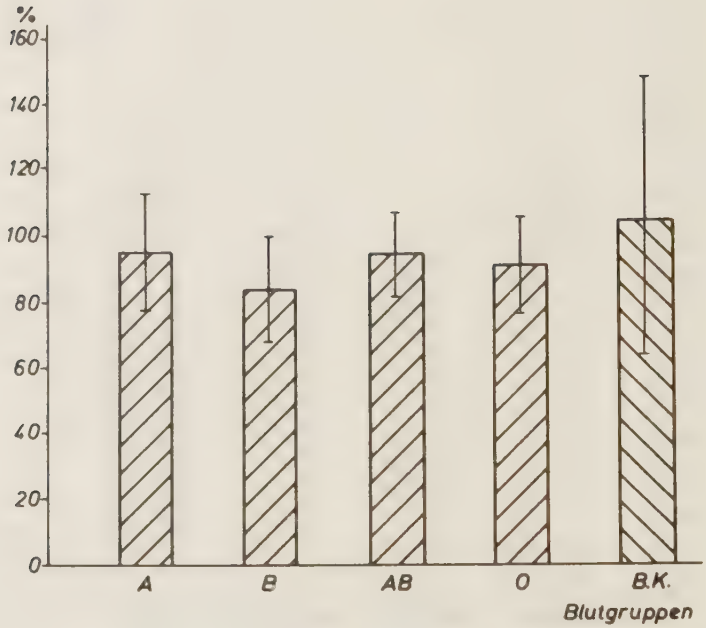


Abb.12: Blutgruppen Plasminogen

4.4. Antiplasmin

Unter Verwendung eines chromogenen Substrates und mittels photometrischer Aktivitätsmessung wurden die Eichkurven aus Verdünnungen zwischen 0% und 125% von lyophilisiertem gepooltem Normalplasma erstellt (Tab.11).

Tab.11: Antiplasmin Eichkurve

Konzentration	h	E
0%	4	0,57075
25%	4	0,496875

50%	4	0,423
75%	4	0,3425
100%	4	0,27575
125%	4	0,2235

Für jede der vier Eichkurven wurde mittels der Extinktionen und ihrer zugehörigen Prozentwerte die Geradengleichungen errechnet (Tab.12, Abb.13).

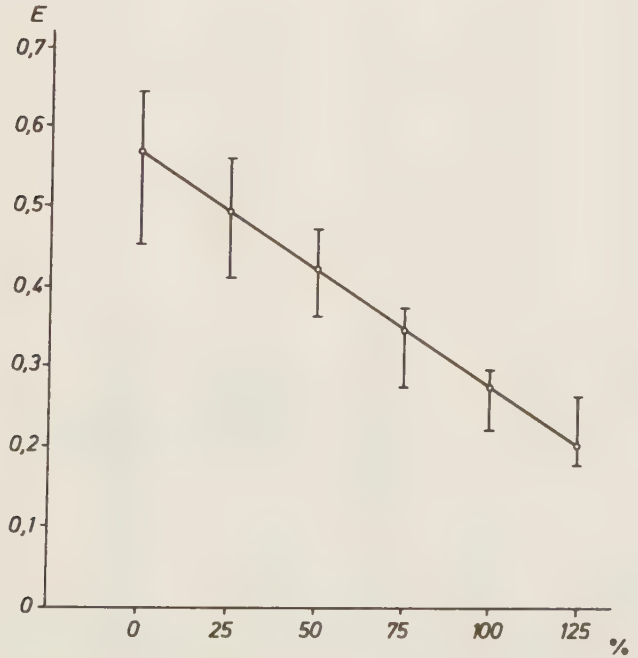


Abb.13: Antiplasmin Gesamteichkurve

Tab.12: Geradengleichungen der Antiplasmin Eichkurven.

Gleichung 1: y = -0,002x + 0,463
Gleichung 2: y = -0,004x + 0,646
Gleichung 3: y = -0,003x + 0,583

Gleichung 4: y = -0,004x + 0,625
Gesamtgleichung : y = -0,003x + 0,579

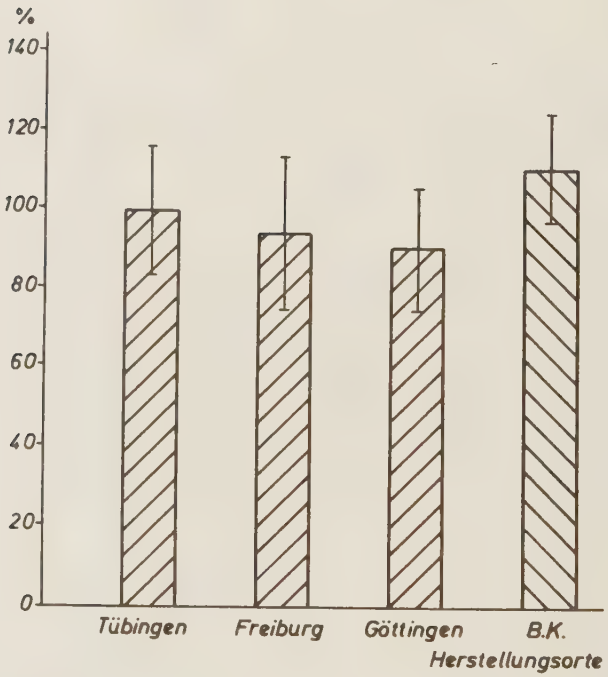


Abb.14: Herstellungsorte Antiplasmin

a)Vergleich der Herstellungsorte

Die Antiplasminbestimmungen der untersuchten gefrorenen Frischplasmen (n=50) ergaben zusammen einen Durchschnittswert von 95% (s=16,8). Die Tübinger GFP (n=21) enthielten 99% (s=16,3), die Freiburger GFP (n=21) 93% (s=18,8) und die Göttinger GFP (n=8) 90% (s=14,1). Sie liegen also alle niedriger als der Wert der Kontrollgruppe (n=22) mit 108% (s=15,0), wobei die Tübinger GFP dem 100%-Wert am nächsten kommt und die Göttinger GFP am

weitesten abweichen (Abb.14).

b)Vergleich der Blutgruppen

Die gefrorenen Frischplasmen mit bekannter Blutgruppe (n=47) schnitten mit 96% Antiplasmingehalt ab. Für die Blutgruppe A (n=19) wurden knapp 100% (s=19,7) bestimmt, für Blutgruppe B (n=7) ebenfalls 100% (s=19,1), für die Blutgruppe AB (n=14) 92% (s=16,6) und für Blutgruppe 0 (n=7) 89% (s=7,5). Somit weicht der Wert der Blutgruppe 0 am meisten vom Wert der Kontrollgruppe (n=22) mit 108% ab, gefolgt vom Wert der Blutgruppe AB, wohingegen Blutgruppe A und B die 100% Marke erreichen (Abb.15).

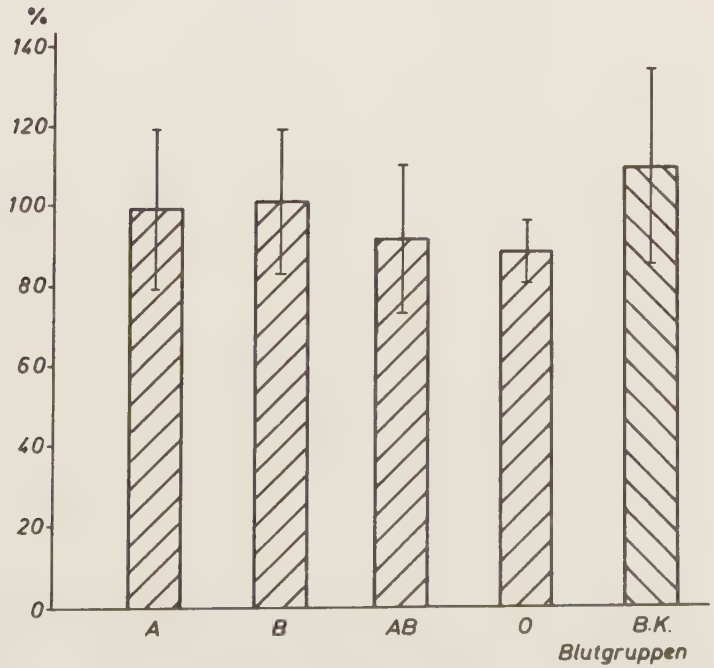


Abb.15: Blutgruppen Antiplasmin

4.5. Fibronektin

Ein turbidimetrischer Immuno-Assay wurde für die Bestimmung der Fibronektinspiegel verwendet. Auch hier wurden von jedem Reagenzienansatz eine Eichkurve ermittelt. Die Verdünnungsreihe wurde zwischen 125 und 1000 µg/ml erstellt (Tab.13).

Tab.13: Fibronektin Eichkurve

Konzentration	h	$\bar{E}$
0µg/ml	3	0,004
125µg/ml	3	0,034
250µg/ml	3	0,0968
500µg/ml	3	0,1565
750µg/ml	3	0,207
1000µg/ml	3	0,2332

Aus Extinktionen und Konzentrationen wurden folgende Kurvengleichungen nach der Grundgleichung $y = e^{(a+bx)}$, berechnet, wobei die Ordinate für den Fibronektingehalt und die Abszisse für die Extinktion steht (Tab.14, Abb.16).

Tab.14: Kurvengleichungen der Fibronektin Eichkurve.

Gleichung 1: $y = e^{(4,524 + 9,87x)}$
Gleichung 2: $y = e^{(4,343 + 11,348x)}$
Gleichung 3: $y = e^{(4,644 + 9,975x)}$
Gesamtgleichung : $y = e^{(4,526 + 10,250x)}$

a)Vergleich der Herstellungsorte

Die Bestimmungen des Fibronektingehaltes der Tübinger gefrorenen Frischplasmen (n=21) ergab einen Durchschnittswert von 230,6 µg/ml (s=55,2), die der

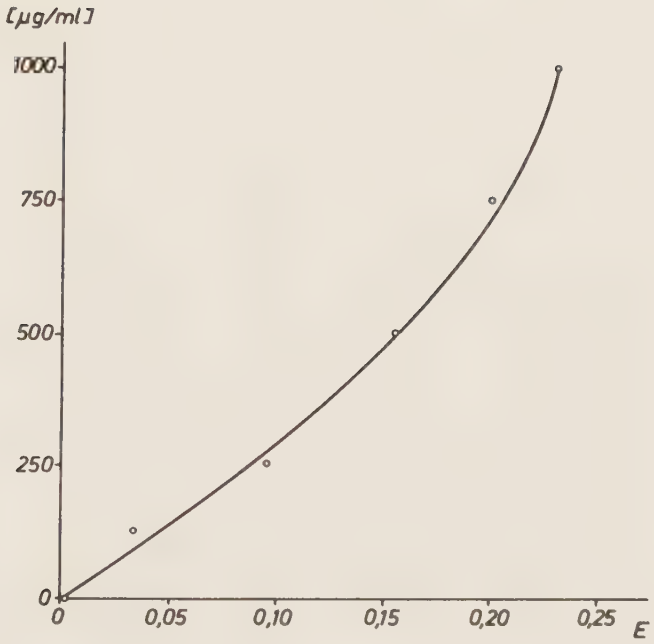


Abb.16: Fibronektin Gesamteichkurve

Freiburger GFP (n=21) 237,1 µg/ml (s=35,9) und die der Göttinger GFP (n=8) 282,9 µg/ml (s=77,2). Der gemeinsame Durchschnittswert (n=50) liegt bei 241,7 µg/ml (s=51,2). Im Vergleich mit dem Kontrollkollektiv (n=22), das durchschnittlich 257,3 µg/ml (s=60,4) Fibronektin enthielt, ist keine wesentliche Abweichung festzustellen, die Tübinger und die Freiburger GFP enthielten geringfügig weniger Fibronektin, die Göttinger GFP enthielten dagegen etwas mehr (Abb.17).

b)Vergleich der Blutgruppen

Betrachtet man den Gehalt an Fibronektin unter Berücksichtigung der Blutgruppenzugehörigkeit, so entfallen auf die Blutgruppe A (n=19) 232,2 µg/ml (s=54,7), auf B

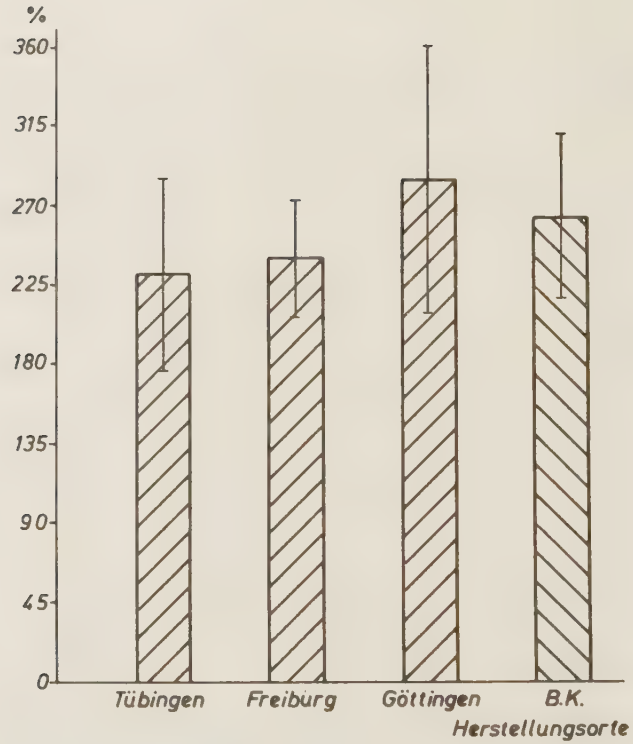


Abb.17: Herstellungsorte Fibronektin

(n=7) 231,1 µg/ml (s=28,6), auf AB (n=14) 258,9 µg/ml (s=58,4) und auf die Gruppe 0 (n=7) 253,1 µg/ml (s=74,3). Zusammengenommen (n=47) ergibt sich der durchschnittliche Fibronektingehalt von 243,1 µg/ml (s=54,4). Die gemessenen Fibronektinwerte der gefrorenen Frischplasmen liegen in unmittelbarer Nähe des Fibronektinwertes der nicht gefrorenen Frischplasmen, wobei die der Blutgruppen A und B etwas niedriger sind als die der Gruppen AB und 0 (Abb.18).

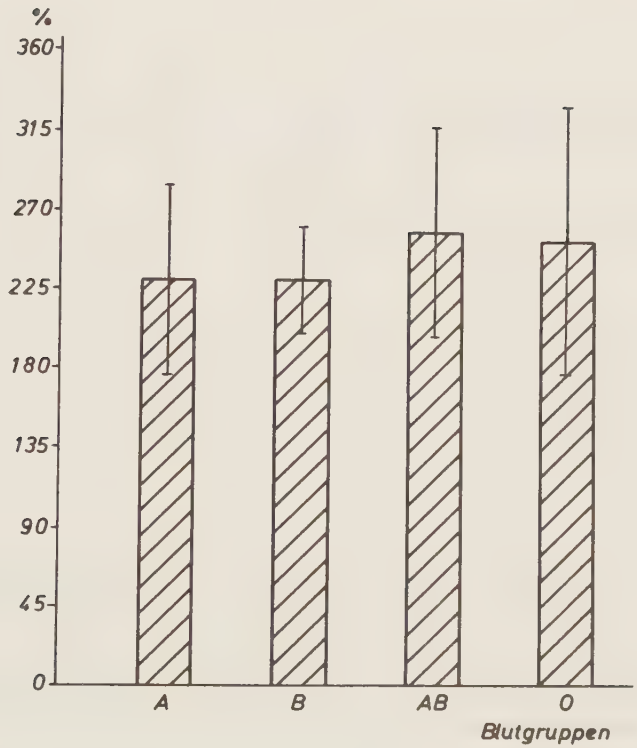


Abb.18: Blutgruppen Fibronektin

5. Diskussion

Das aus frischem Vollblut durch Zentrifugieren, Abfüllen in spezielle Plastikbeutel und Tiefgefrieren gewonnene Frischplasma ist in seinem Werdegang etlicher Alterationen ausgesetzt. Wie in der oben genannten Literatur beschrieben, wurde für einige Gerinnungsfaktoren bereits nachgewiesen, daß sie in GFP in gesteigerter Aktivität vorliegen (75).

Bei Praekallikrein verhält sich die Aktivitätsveränderung nun so, daß der Wert des Bezugskollektivs übertroffen wird. Die Praekallikreinaktivität in GFP liegt knapp ein Drittel über derjenigen des Frischplasmas des Bezugskollektivs. Der in der Literatur beschriebene Normalbereich für Praekallikreinktivität (100±26%) im Plasma des Menschen wurde teilweise sogar überschritten (3, 38).

Für die durchgeführten Kallikreinbestimmungen gilt, daß der Kallikreingehalt im frischem Plasma vom Kallikreingehalt im GFP um ein Sechstel bis ein Drittel überschritten wird. Betrachtet man die Kallikreinaktivität unter dem Aspekt der Blutgruppenzugehörigkeit, so kann für jede Blutgruppe festgehalten werden, daß eine Aktivitätszunahme zu verzeichnen ist. Die Aktivitätszunahme der Blutgruppe A und AB ist um mehr als das Doppelte größer als die Aktivitätszunahme der Blutgruppen B und O.

Die Aktivitätsänderung von Plasminogen, zeigt die umgekehrte Tendenz. Die Plasminogenaktivität in Frischplasma wird von der in GFP unterschritten. Allerdings enthielt kein GFP weniger Plasminogenaktivität als in der Literatur als Normalbereichsgrenze (100±28) angegeben wird (6, 38). Ähnlich verhält sich die Aktivitätsänderung von Antiplasmin. Die Antiplasminaktivität in GFP ist niedriger als die in Frischplasma. Allerdings liegen auch die Antiplasmin-aktivitäten in GFP innerhalb des in der Literatur beschriebenen Normalbereichs (103±19%) (38).

Bei Fibronektin kann keine Veränderung der Aktivität in GFP im Vergleich mit der Aktivität in Frischplasma festgemacht werden. Beide Kollektive bewegen sich inderselben Region des literaturbeschriebenen Normalbereichs (150-800µg/ml) (50).

Betrachtet man nun die Aktivitätsänderungen der Faktoren in GFP unter Berücksichtigung der Herstellungsorte, so besteht kein Anhaltspunkt für einen signifikanten Qualitätsunterschied zwischen den Tübinger, Freiburger und Göttinger GFP. Die Faktorenaktivität unterliegt zwar im einzelnen einer gewissen Schwankung, aber es ist keine statistisch erhärtbare Tendenz gegeben. Die GFP der genannten Herstellungsorte können also als gleichwertig betrachtet werden.

Die statistische Auswertung der Aktivitätsänderungen unter Einbeziehung der Blutgruppenzugehörigkeit, ergibt zwar für die Praekallikrein- und Kallikreinbestimmungen eine Tendenz, aber keine Signifikanz. Die GFP der Blutgruppen A und AB enthalten eine höhere Aktivität an Praekallikrein und Kallikrein als die GFP der Blutgruppen B und O. Diese stärkere Aktivitätsveränderung läßt sich bei den drei anderen Plasmafaktoren nicht verfolgen.

Für Faktoren, die durch Oberflächenkontakt aktiviert werden können, gilt, daß sie im gefrorenem Frischplasma bereits verstärkt von der inaktiven in die aktive Form übergegangen sind, dies entspricht einer Verkürzung der Fibrinbildungszeit bei normaler Faktorenmenge. Ebenso führt ein unvollständiger Ca^{2+}-Ionenentzug zu einer Verkürzung der Fibrinbildungszeit, ohne daß der Gehalt an den hierdurch aktivierten Faktoren erhöht wäre, vielmehr sind Teilschritte der Gerinnung abgelaufen (98). Welche Auswirkungen diese Tatsachen auf den Patienten haben, muß die klinische Beobachtung erbringen.

6. Zusammenfassung

Bei der vorliegenden Untersuchung werden die Werte der Plasmabestandteile Praekallikrein, Kallikrein, Plasminogen, Antiplasmin und Fibronektin in gefrorenem Frischplasma bestimmt und getrennt nach Herstellungsorten und nach Blutgruppenzugehörigkeit betrachtet.

Im Vergleich zum Bezugskollektiv, wofür Frischplasma gemessen wurde, erfahren Praekallikrein und Kallikrein in GFP eine Aktivitätszunahme, Plasminogen und Antiplasmin eine Aktivitätseinbuße und Fibronektin keine Veränderung.

Die Aktivität der bestimmten Plasmafaktoren bewegte sich noch innerhalb der literaturbeschriebenen Normbereiche, oder überschritt diese geringfügig. Die vorgefundene Aktivitätszunahme, könnte durch Fremdoberflächenaktivierung und konsekutive Verkürzung der Fibrinbildungszeit verursacht sein.

Die Auswertung der Ergebnisse getrennt nach Herstellungsorten ergab, daß die GFP aus Tübingen, Freiburg und Göttingen als gleichwertig zu betrachten sind.

Die Betrachtung unter Berücksichtigung der Blutgruppenzugehörigkeit ergab keine eindeutige Modifikation der genannten Tendenz.

7. Literaturverzeichnis

1. Ali, U., Mautner, V.M., Lanza, R., Hymes, R.O. (1977)
   Restoration of normal morphology, adhesion and cytoskeleton in transformed cells by addition of transformation-sensitiv surface protein
   Cell 11, 115-126
2. Allain, J.P., Friedli, H., Morgenthaler, J.-J., Pflugshaupt, R., Gunson, H.H., Lane, R.S., Myllylä, G., Roek, G., Schorr, J.B., Menache-Aronson, D., Stryker, M.H., Woods, K.R., Sturgenor, D.M. (1983)
   What are the critical faktors in the produktion and quality controle of frozen plasma intended for direkt transfusion or for fraktionation to provide medically needed labile coagulation factors?
   Vox Sang. 44, 246-259
3. Alstaedt, R. (1979)
   Kallikrein (Padutin®), ©Bayropharm Köln, 13-18
   Druckerei Schertgens GmbH, Köln
4. American Association of Blood Banks (1977)
   Technical Manual, 7th ed.
   1828 L Street, N.W., Washington D.C. 20036
5. Amundson, E., Aasen, A.O., Gallimore, M.J., Larsbraaten, M., Lyngaas, K. (1979)
   The plasma-kallikrein-kinin system in endotoxin shock in dogs, 72-82
   in: Scully, M.F., Kakkar, V.V.: Chromogenic peptide substrates-chemystry and clinical usage;
   Churchill Livingston Verlag, Edinburgh-London-New York
6. Angelkort, B. (1981)
   Hämostase
   Essentialia 2, 23-29
7. Angelkort, B., Kienel, R. (1978)
   Zuverlässigkeit und Aussagekraft der photometrischen Bestimmung von Plasminogen, Plasmin und Antiplasmin mit der chromogenen Substanz S-2251, 257-262

in: Breddin, H.K.: Prostaglandine und Plättchen-funktionen;
F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York

8. Anstall, H.B., Grove-Rasmussen, M., Shaw, R.S. (1961)
Optimal conditions for storage of fresh frozen plasma
Transfusion 1, 87-93
9. Aronson, K.F., Eklund, G., Kindmark, C.O., Laurell, C.B. (1972)
Sequential changes of plasmaproteins after surgical trauma
Scand. j. clin. lab. invest. 29, suppl.124, 127-136
10. Aufnahmebogen für Blutspender
Institut für Anästesiologie und Transfusionsmedizin, Abt. Transfusionsmedizin des Klinikums der Universität Tübingen
11. Balian, G., Cliek, E.M., Bornstein, P. (1980)
Location of a collagen binding domain in fibronectin
J. Biol. Chem. 255, 3234
12. Bang, N.V., Hansen, M.S., Smith, G.F., Mosesson, M.W. (1973)
Properties of soluble fibrin polymers encountered in thrombotic states
Thromb. diathese haemorrh. 56, 75-90
13. Barthels, M., Stangel, W., Poliwoda, H., Trobisch, H. (1974)
Untersuchungen zur Frage der Aktivierung des Gerinnungs-systems in Blutkonserven
Blut XXIX, 289-296
14. Becker, D., Kurth, R., Crithly, D., Fries, R., Heinz, B. J. (1977)
Distinguishable transformation-defective phenotypes among temperature sensitive mutants of rous-sarcoma virus
J. virol. 21, 1042-1055
15. Blumenstock, F., Weber, P., Saba, T.M., Laffin, R. (1977)

Electroimmunoassay of alpha-2-opsonic protein during reticuloendothelial blockade
Am. j. physiol. regulatory integrative comp. physiol. 1, 80-87

16. Boehringer Mannheim GmbH
Laborvorschrift Fibronectin-Opsonic Protein

17. Bundesärztekammer (1980)
in: Wissenschaftliche Schriftreihe: Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion
Deutscher Ärzte-Verlag, Köln

18. Chen, L.B., Gallimore, P.H., Mc Dougall, J.K. (1976)
Correlation between tumor induction and the large external transformation sensitive protein on the cell surface
Proc. nat. acad. sci. (USA) 73, 3570-3574

19. Chen, L.B., Summerhayes, I., Hsieh, P., Gallimore, P.H. (1979)
Possible role of fibronectin in malignancy
J. supramol. structure 12, 505-516

20. Claeson, C., Friberger, P., Knös, M., Eriksson, E. (1978)
Methods for determination of prekallikrein in plasma, glandular kallikrein and urocinase
Haemostas. 7, 76-78

21. Claeys, H., Molla, A., Verstraete, M. (1973)
Conversion of NH_2-terminal glutamine acid to NH_2-terminal lysine human plasminogen by plasmin
Thromb. res. 3, 515-523

22. Cochrane, C.G., Revak, S.d., Wuepper, K.D., Johnston, A., Morrison, D.C., Ulevitch, R. (1974)
Soluble mediators of injury of microvaskulature; Hageman factor and kinin forming intrinsic clotting and fibrinolytic system
Microvasc. res. 8, 112-121

23. Collen, D., Ong, E.G., Johnson, A.J. (1975)
Human plasminogen: in vitro and in vivo evidence for

the biological integrity of NH_2-terminal glutamic acid plasminogen
Thromb. res. 7, 515-529

24. Davie, E.w., Ratnoff, O.D. (1964)
Waterfall sequence for intrinsic blood clotting
Science 145, 1310

25. Denks, S., Eisen, V., Blümel, G. (1975)
Effect of organic kallikrein and blood coagulation, complement and esterolytic activity of plasmin, 41-53
in: Haberland, G.L., Rohen, J.W., Blümel, G., Huber, P.: Kinogenase-Kallikrein III;
F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York

26. Dennhardt, R., Haberich, F.J. (1973)
Effect of kallikrein on the absorption of water, electrolytes and hexoses in the intestine of rats, 81-88
in: Haberland, G.L., Rohen, J.W., Suzuki, T.: Kinogenases-Kallikrein I;
F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York

27. Dessau, W., Adelmann, B.C., Timpl, R., Martin, G.R. (1978)
Identifikation of the sites in collagen a-chaine that bind serum antigen-gelatin factor (cold insoluble globuline)
Biochem. j. 169, 55-59

28. Dutta, A.K., Dutta, R.N. (1978)
Anti-haemophilic factor in cryoprecipitate of fresh plasma and aged plasma: preparation and concentration during storage
Indian j. med. res. 68, 495-505

29. Edsall, J.T., Gilbert, G.A., Scherage, H.A. (1955)
The non-clotting component of the human plasma fraction I-1 ("cold insoluble globuline")
J. am. chem. soc. 77, 157-161

30. Edy, J., de Cock, F., Collen, D. (1976)
Inhibition of plasmin by normal and antiplasmin depleted plasma

Thromb. res. 8, 513-522

31. Ehrismann, R., Chiquet, M., Turner, D.C. (1981)
Mode of action of fibronectin in promoting chicken myoblast attachment. Mr=60.000 gelatin binding fragment binds nativ fibronectin
J. biol. chem. 256, 4056

32. Engel, J., Odermatt, E., Engel, A., Madri, J.A., Furthmayr, H., Rohde, H., Timpl, R. (1981)
Shapes, domain organisations and flexibility of lamin and fibronectin two multifunctional proteins of the extracellular matrix
J. mol. biol. 150, 97

33. Erdös, E.G. (1975)
Angiotensin I converting Enzym
Circ. res. 36, 247-255

34. Erdös, E.G. (1976)
Kinase II, das Angiotensin I converting Enzym
Am. j. med. 60, 746

35. Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. (1980)
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 153
Bibliographisches Institut, Mannheim-Wien-Zürich

36. Frey, E.K., Kraut, H. (1928)
Ein neues Kreislaufhormon und seine Wirkung
Arch. exp. Path. Pharmacol. 133, 1-56

37. Friberger, P. (1978)
Methods for determination of plasmin, antiplasmin and plasminogen by means of substrate S-2251
Haemostasis 7, 138-149

38. Friberger, P. (1982)
Chromogenic peptide substrates
Scand. j. clin. lab. invest. 42, 162

39. Friberger, P., Knös, M. (1979)
Plasminogen determination in human plasma, 128-199
in: Scully, M.F., Kakkar, V.V.: Chromogenic peptide substrates-chemistry and clinical usage;

Churchill Livingston Verlag, Edinburgh-London-New York

40. Frucht, L.T., Wendelschafer-Crabb, G., Mosher, D.F., Arneson, M., Hammerschmidt, P., Woodbridge, P. (1979) The role of fibronectin in normal platelet aggregation and demaonstration of an inherited disease with defectiv platelet aggregation correctable with normal fibronectin J. cell. biol. 83, 61a
41. Furie, M.B., Rifkin, D.B. (1980) Proteolytically derivied fragments of human plasma fibronectin and their localization within the intact molecule J. biol. chem. 255, 3134
42. Fyrand, O., Solum, N.O. (1979) Heparin precipitable fraction (HPF) from dermatological patients. II studies on the non-clottable proteins-identification of cold insoluble globulin as the main-clottable component Thromb. res. 8, 659-672
43. Gallimore, P.H. (1975) Seruminhibitores of fibrinolysis Brit. j. haematol. 31, 217-231
44. Gallimore, P.H., Mc.Dougall, J.K., Chen, L.B. (1977) Invitro trails of adenovirus transformed cell lines and their relevance to tumor genicity in nude mice Cell 10, 669-678
45. Ginsberg, M.H., Pointer, R.G., Forsyth, J., Birdwell, C. Plow, E.F. (1980) Thrombin increases expression of fibronectin antigen on the platelet surface Proc. natl. acad. sci. (USA) 77, 1049-1053
46. Gulba, D., Heller, W., Hoffmeister, h.-E., Huth, Ch. (1983) Studies on the fibronectin level under extracorporal circulation conditions using a turbidimetric immuno-assay-fibronectin mediates the precipitation of soluble fibrin in the cold, while it maintaines their solubility

at physiological temperatures, 61-67
in: Erbring, R., Klingemann, H.-G.: Factor XIII and fibronectin-new clinical and biological approaches; Die Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg

47. Gunson, H.H., Dunleary, J. (1982)
Modern trends in blood transfusion: the use of computerisation,
in: Hoffbrand, v.A.V.: Recent advances in haematology 3; Churchill Livingston Verlag, London

48. Haberland, G.L., Rohen, J.W., Suzuki, T. (1977)
Kininogenases-kallikrein, 4th symposium on physiological properties and pharmacological rationale, Mainz, 25.-26. 4.1977, 1 und 365
F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York

49. Haberland, G.L. (1978)
The role of kininogenases, kinin formation and kininogenase inhibition in post traumatic shock and related conditions
Klin. Wschr. 56, 325-331

50. Hörmann, H. (1982)
Fibronektin (kälteunlösliches Globulin) - ein Haftfaktor für Zellen und seine Steuerung
Hämostaseologie 1, 57/38-67/47

51. Hörmann, H., Jelinec, V. (1981)
Regulation by heparin and hyaluronic acid of the fibronectin-dependend assoziation of collagen typ III with macrophages
Hoppe Seyler's Z. physiol. chem. 362, 87-93

52. Harder, A.J., Straub, P.W. (1972)
In vitro and in vivo induction of cryofibrinogen and "paracoagulation" by reptilase
Thromb. diathese haemorrh. 27, 337-348

53. Harke, H. (1982)
Massivtransfusionen: Haemostase und Schocklunge
Springer, Berlin Heidelberg New York

54. Highsmith, R.F., Rosenberg, R.D. (1974)

The inhibition of human plasmin by human antithrombin heparin cofactor
J. biol. chem. 249, 4335-4338

55. Hogg, N.M. (1974)
A comparison of membrane proteins of normal and transformed cells by lactoperoxidase labelling
Proc. natl. acad. sci. USA 71, 489

56. Hopper, K.E., Adelmann, B.C., Gentner, G., Gay, G., Gay, S. (1976)
Recognition by guinea-pig peritoneal exsudate cells of conformationally different states of the collagen molecule
Immunology 30, 249-257

57. Hynes, R.O. (1973)
Alteration of cell-surface proteins by viral transformation and by proteolysis
Proc. natl. acad. sci. USA 70, 3170

58. Inagami, T., Takahashi, N., Yokosawa, N., Tokii, Y. (1978)
International symposium on kinins, Tokio, 6.-9.11.1978

59. Iwanga, S., Suzuki, K., Hashimoto, S. (1978)
Bovine plasma cold-insoluble globulin; gross structure and function
Ann. N. Y. acad. sci. 312, 56-73

60. Jilek, F., Hörmann, H. (1977)
Cold-insoluble globulin, II plasminolysis of cold-insoluble globulin
Hoppe Seyler's Z. physiol. chem. 358, 133

61. Jilek, F., Hörmann, H. (1979)
Fibronectin (cold-insoluble globulin), VI influence of heparin and hyaluronic acid on the binding of nativ collagen
Hoppe Seyler's Z. physiol. chem. 360,

62. Kabi Diagnostika
Coattest® Antiplasmin und Substrate S-2251

S-11287 Stockholm, Schweden

63. Kabi Diagnostika
S-2302 determination of kallikrein-like activity in plasma
S-11287 Stockholm, Schweden

64. Kabi Diagnostika
S-2251 determination of plasminogen in plasma
S-11287 Stockholm, Schweden

65. Kabi Diagnostika
S-2302 determination of prekallikrein in plasma
S-11287 Stockholm, Schweden

66. Kaplan, A.P., Austen, K.F. (1970)
A pre-albumin activator of prekallikrein
J. immunol. 105, 802-811

67. Kaplan, A.P., Austen, K.F. (1971)
A prealbumin activator of prekallikrein II. derivation of activators of prekallikrein from active Hageman factor by digestion with plasmin
J. exp. med. 133, 696-712

68. Kaplan, A.P., Austen, K.F. (1972)
The fibrinolytic pathway of human plasma. Isolation and characterization of plasminogen proactivator
J. exp. med. 136, 1378-1393

69. Kaplan, J.E., Molnar, J., Saba, T.M., Allen, C. (1976)
Comparativ disappearence and localization of isotopically labbeled opsonic protein and soluble albumin following surgical trauma
J. reticuloendothel. soc. 20, 375-384

70. Kaplan, J.E., Saba, T.M. (1976)
Humoral difficiency and reticuloendothelial depression after traumatic shock
Am. j. physiol. 230, 7-14

71. Kaplan, A.P., Schreiber, A.D., Austen, K.F. (1972)
Isolation and reaction mechanism of human plasma plasminogen activator and its precusor
Fed. proc. 31, 624a

72. Karges, H.e., Schwinn, H., Becker, K., Heimberger, N. (1979)
Großer Gerinnungsstatus
Medizinische Inf. u. Vertrieb, Behring Werke A.G., 8-11
73. Keski-Oja, J., Mosher, D.F., Vaheri, A. (1976)
Cross-linking of a major fibroblast surface-associated glycoprotein (fibronectin) catalyzed by blood coagulation factor XII
Cell, 9, 29-35
74. Klauser, R.J., Blümel, G. (1980)
Zur Bestimmung der Kallikreinausscheidung im Urin
Med. Welt, 31, 521-522
75. Koerner, K., Stempe, D., Kubanek, B. (1981)
Das tiefgefrorene Frischplasma in der Blutkomponententherapie: Herstellung - Qualitätskontrolle - Indikation
Transfusionsth., 8, 253-258
76. Kosow, D.P. (1975)
Kinetic mechanism of the activation of human plasminogen by streptokinase
Biochem. 14, 4459-4464
77. Kurkinen, M., Vartio, T., Vaheri, A. (1980)
Polypeptides of human plasma fibronectin are similar but not identical
Biochem. Biophys. Acta 624, 490
78. Kuusella, P., Ruoslahti, E., Engvall, E., Vaheri, A., Vaheri, E. (1976)
Immunological interspecies eross reaction of fibroblast surface antigen (fibronectin)
Immunochem. 13, 639-642
79. Laake, K., Gjönnaess, H., Fagerhol, M.K. (1973)
Components of the kallikrein-kinin system and the spontaneous cold activation of factor VII in human plasma
Acta pharmacol. toxicol. 33, 229-240
80. Laake, K., Venneröd, A.M., Haugen, G., Gjönnaess, H. (1974)

Studies on the associated acyl-arginine esterase activity
Thromb. res. 4, 769-785

81. Leidl, W., Prinzen, R., Schill, W.-B., Fritz, H. (1975)
The effect of kallikrein on motility of spermatozoa in vitro, 33-40
in: Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schirren, C., huber, P. : Kinogenases-kallikrein II
F.K. Schattauer, Stuttgart - New-York

82. Margolius, H.S., Geller, R., Pisano, J.J., Sjoerdsma, A. (1971)
Altered urinary kallikrein excretion in human hypertension
Lancet II, 1063-1065

83. Margolius, H.S., Hornitz, D., Pisano, J.J., Keiser, H.R. (1974)
Urinary kallikrein excretion in hypertension man. Relationship to sodium intake and sodium-retaining steroids
Circulat. res. 9, 820-825

84. Matsuda, M., Saida, T., Hasegawa, R. (1976)
Cryofibrinogen in plasma of patients with skin ulceration lesions on legs - complex of fibrinogen and cold insoluble globulin
Thromb. res. 9, 541-552

85. Maurer, P.H. (1954)
I. antigenicity of oxypolygelatin and gelatin in man
J. exp. med. 100, 497-513

86. Meng, K., Haberland, G.L. (1973)
Influences of kallikrein on glucose transport in isolated rat intestine, 75-80
in: Haberland, G.L., Rohen, J.W., Suzuki, T. : Kinogenases-kallikrein I;
F.K. Schattauer, Stuttgart - New-york

87. Meyer, A., Werle, E. (1964)

Beeinflussung des Endotoxinschocks durch den Trypsin-Kallikrein Inhibitor, 299-305
in: Henning, N., Heinkel, K., Schön, H. : Pathogenese, Diagnose, Klinik und Therapie der Erkrankungen des exokrinen Pankreas;
F.K. Schattauer, Stuttgart - New-York

88. Morrison, P.R., Edsall, J.T., Miller, S.G. (1948)
Preparation and properties of serum and plasma proteins XVIII. The separation of purified fibrinogen from fraction I of human plasma
J. am. chem. soc. 70, 3103-3109

89. Mosher, D.F. (1974)
Crosslincing of cold insoluble globulin by fibrin stabilizing factor
Fed. proc. 33, 1452a

90. Mosher, D.F. (1975)
Crosslincing of cold insoluble globulin by fibrin stabilizing factor
J. Biol. chem. 250, 6614-6621

91. Mosher, D.F. (1980)
Fibronectin, 111
in: Th. Spaet. Ed. : Progress in hemostasis and thrombosis Vol.5
Grune und Stratton, Inc., New-York
Grune u. Stratton, Inc., New-York

92. Nakajima, T., Hirsch, E.F., Oshima, G., Erdös, E.G., Herman, C.M. (1973)
Kininogenabfall bei septischem Schock des Menschen, 137-147
in: Haberland, G.L., Lewis, D.J.: Neue Aspekte der Trasyol Therapie VI
Schattauer Verlag, Stuttgart - New-York

93. Nilsson, T., Rudolphi, O., Cedergren, B. (1983)
Effects of intensive plasmapheresis on the haemostatic system

Scand. J. Haematol. 30, 201-206

94. Schneider, W. (1981)
Vorläufiges Verfahren zur Herstellung von FFP
Merkblatt der Blutbank Tübingen

95. Schneider, W.
Grundlagen der Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin
Merkblatt der Blutbank Tübingen für Studierende der Universität Tübingen

96. Spielmann, W. (1982)
Transfusionskunde, 1-33
Georg Thime Verlag, Stuttgart

97. Werle, E., Götze, W., Keppler, A. (1937)
Praekallikrein
Biochem. Z. 289, 217

98. Witt, J., Hasler, K. (1978)
Klinische Bedeutung von Gerinnungsanalysen mit chromogenen Peptidsubstraten, 227-243
in: Breddin, H.K.: Prostaglandine und Plättchenfunktion
F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart - New-York

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. W. Heller für die freundliche Überlassung des Themas und vielen nützlichen Anregungen danken.

Desweiteren gilt mein Dank Herrn Dr. rer. nat. A. Hernanto für die vielen nützlichen Anregungen, die engagierte Unterstützung und Beratung.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Frau Pietsch-Breitfeld Vom Institut für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen für ihre geduldige und fachkundige Hilfe bedanken.

Lebenslauf:

Am 19. Juni 1958 wurde ich, Sabine Wallmeier geb. Adolph, als viertes Kind der Eheleute Anneliese geb. Rösch und Dr. Wolfgang Adolph in Tübingen (Württem.) geboren. Seit meinem zweiten Lebensjahr verbrachte ich meine Kindheit in Stuttgart und besuchte dort Volksschule und Gymnasium. Nach einem weiteren Umzug 1974 legte ich im Mai 1978 in Tübingen am Wildermuth-Gymnasium die Reifeprüfung und das große Latinum ab. Im Sommersemester 1979 begann ich in Tübingen das Studium der Medizin, wo ich im Mai 1981 die Ärztliche Vorprüfung bestand. Am 6. Mai 1986 beendete ich mit dem 3. Staatsexamen das Medizinstudium.

Druck Köhler Tübingen